

Aus der
Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg / Saar
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Danilo Fliser

Bedeutung der Monozytenheterogenität bei Adipositas und Atherosklerose

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

Vorgelegt von Florian Hornof
geboren am 08. Februar 1981 in Hildesheim

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Zusammenfassung.....	8
1.1 Deutsche Zusammenfassung	8
1.2 Summary	10
2 Einleitung	12
2.1 Bedeutung der Atherosklerose	12
2.2 Biologie der Monozyten.....	14
2.3 Zielsetzung der HOM sweet HOMe Studie	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.2 Methoden.....	18
4 Ergebnisse	28
4.1 Charakteristika des Gesamtkollektivs	28
4.2 Stratifikation anhand des koronarangiographischen Befundes	30
4.3 Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	32
4.4 Die Monozytensubpopulationen in der Koronaren Herzkrankheit	33
4.5 Korrelationen zwischen Monozyten(subpopulationen) und kardiovaskulären Risikofaktoren	35
4.6 Adipositas und Monozyten.....	39
4.7 Vergleich zwischen Patienten des aktuellen Kollektivs (HOM sweet HOMe) und Probanden einer vorangegangenen Untersuchung (I LIKE HOMe).....	46
5 Diskussion	49
5.1 Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	49

5.2	Monozyten und Koronare Herzkrankheit.....	51
5.3	Monozyten und Adipositas.....	56
5.4	Einschränkungen	59
5.5	Schlussfolgerungen	60
6	Literaturverzeichnis.....	62
7	Danksagung.....	70
8	Publikation.....	72
9	Anhang	73
9.1	Material	73
9.2	Fragebogen zur Erhebung pectanginöser Beschwerden und peripher arterieller Verschlusskrankheit	77
10	Lebenslauf.....	85

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bezeichnung</u>
°C	Grad Celsius
A.; Aa.	Arterie; Arterien
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATM	Adipose tissue macrophages
BD	Becton Dickinson
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCL2	Chemokine (CC motif) ligand 2 (= MCP-1)
CCR [1,2,5]	Chemokine (CC motif) receptor [1,2,5]
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CX	Ramus circumflexus
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
D	Bundesrepublik Deutschland
dest.	Destilliert
dl	Deziliter
DM	Diabetes mellitus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

et al.	et alia
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal calf serum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FKN	Fraktalkin
FSC	Forward scatter
G	Gramm
HDL	High density lipoprotein
HF	Herzfrequenz
HIV	Human immunodeficiency virus
HMG-CoA-Reduktase	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HOM sweet HOMe	Heterogeneity of monocytes in subjects with coronary heart disease – The Homburg evaluation
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IF	Interferon
IL	Interleukin
I LIKE HOMe	Inflammation, Lipid Metabolism and Kidney Disease in Early Atherogenesis – The Homburg Evaluation
IRI _{HOMA}	Insulin Resistance Index homeostasis model assessment
ISI _{HOMA}	Insulin Secretion Index homeostasis model assessment
KHK	Koronare Herzkrankheit

LAD	Left anterior descending (= Ramus interventricularis anterior / RIVA)
LCA	Left coronary artery
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1 (= CCL2)
n	Anzahl
NaN ₃	Natriumazid
ox-LDL	oxidiertes LDL-Cholesterin
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii
RANTES	Regulated on Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted
RCA	Right coronary artery

RIVA	Ramus interventricularis anterior (= Left anterior descending / LAD)
RR	Blutdruckmessung nach Riva-Rocci
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SSC	Sideward scatter
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
VCAM	vascular cell adhesion molecule
vgl.	Vergleiche
Vs	Versus

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge.

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Einleitung

Atherosklerotisch bedingte Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in der industrialisierten Welt dar. Die Entstehung der Atherosklerose wird inzwischen als ein inflammatorischer Prozess verstanden, in dem Monozyten eine zentrale Rolle spielen. In den letzten Jahren wurden phänotypisch und funktionell divergente Monozytensubpopulationen charakterisiert. Gleichzeitig konnten vorangegangene Untersuchungen Assoziationen zwischen bestimmten Monozytensubpopulationen und kardiovaskulären Ereignissen bei nierenkranken Patienten aufzeigen. Die Bedeutung der Monozytenheterogenität bei nierengesunden Menschen mit atherosklerotischen Gefäßkomplikationen ist hingegen noch weitgehend unklar. Die vorliegende Arbeit überprüft daher die Hypothese, dass Patienten mit Koronarer Herzkrankheit eine erhöhte Zellzahl von präsumtiv proinflammatorischen CD16⁺ Monozyten aufweisen.

Methodik

440 Patienten wurden koronarangiographisch auf das Vorliegen der Koronaren Herzkrankheit untersucht, das kardiovaskuläre Risikoprofil wurde ermittelt und zusätzlich eine Immunphäotypisierung der Monozytensubpopulationen vorgenommen. Hierzu wurde nach einer Vollblutfärbung mit fluoreszierenden Antikörpern eine durchflusszytometrische Analyse der Monozyten durchgeführt, nach der die Monozyten anhand definierter Kriterien in drei Subpopulationen (CD14⁺⁺CD16⁻; CD14⁺⁺CD16⁺ und CD14⁺CD16⁺) eingeteilt wurden. Als Parameter der Adipositas wurden Körpergewicht, Body Mass Index, Hüft- und Taillenumfang erfasst und die Insulinresistenz mittels Insulin resistance index homeostasis model assessment (IRI_{HOMA}) und Insulin secretion index homeostasis model assessment (ISI_{HOMA}) errechnet.

Ergebnisse

Patienten mit Koronarer Herzkrankheit weisen gegenüber koronargesunden Probanden tendenziell mehr Gesamtmonozyten auf. Jedoch ist keine der drei definierten Monozytensubpopulationen signifikant mit dem Vorliegen der Koronaren Herzkrankheit assoziiert. Allerdings unterschieden sich beide Patientengruppen in ihrer medikamentösen Therapie bei Studieneinschluss, so wurden 69,2 % der Patienten mit Koronarer Herzkrankheit, jedoch nur 26,0 % der Patienten der Kontrollgruppe, mit einem Statin behandelt.

Interessanterweise zeigt sich darüber hinaus eine deutliche Korrelation zwischen der Subpopulation der CD14⁺CD16⁺ Monozyten und Parametern der Adipositas. So korrelieren die Zellzahlen der CD14⁺CD16⁺ Monozyten, nicht jedoch die Gesamtmonozyten oder eine andere Monozytensubpopulation mit Körpergewicht, Body Mass Index, Bauchumfang und mit einer Insulinresistenz der Patienten.

Schlussfolgerung

Im Gegensatz zu unserer Hypothese zeigte sich bei Patienten mit manifester Koronarer Herzkrankheit keine erhöhte Zellzahl der präsumtiv proinflammatorischen CD16⁺ Monozyten. Somit können Ergebnisse aus Untersuchungen von chronisch nierenkranken Patienten hinsichtlich prävalenter kardiovaskulärer Erkrankungen und CD16⁺ Monozyten nicht unkritisch auf nierengesunde Patienten übertragen werden. Allerdings ist in der vorliegenden Arbeit ein immunmodulierender Effekt der pleiotrop wirkenden Statine auf die Monozytenheterogenität nicht auszuschließen. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Hingegen konnte eine relevante Zellzahlverschiebung zugunsten der CD14⁺CD16⁺ Monozyten mit progredienter Adipositas und Insulinresistenz beobachtet werden. Dies weist auf einen potentiellen Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen des Fettgewebes (Adipokine) auf die Monozytenheterogenität hin. Der mögliche Einfluss unterschiedlicher Adipokine auf die Differenzierung der Monozyten sollte in weiteren Studien untersucht werden.

1.2 Summary

Introduction

Atherosclerotic vascular disease is the principal cause of death in industrialized countries. Monocytes are strongly involved in initiation and progression of atherosclerosis, which is nowadays considered a chronic inflammatory disease. The impact of monocyte heterogeneity has recently gained substantial interest, as an association between subpopulations presumably proinflammatory monocytes and cardiovascular disease was reported in a highly selected cohort of patients with chronic kidney disease. The importance of monocyte heterogeneity in patients with cardiovascular disease and intact renal function is still unclear. We therefore hypothesized that elevated numbers of presumably proinflammatory CD16⁺ monocytes are associated with cardiovascular disease in the general population.

Methods

We recruited 440 patients who underwent elective coronary angiography for diagnosis of coronary artery disease. We characterized monocyte subsets by flow cytometry after staining with fluorescence coated antibodies in a whole blood assay. Monocytes were differentiated into three subsets: CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺. Traditional cardiovascular risk factors were assessed. Furthermore, body weight, body mass index as well as waist and hip circumference were measured as parameters of obesity, and insulin resistance and secretion index were calculated with homeostasis model assessment (Insulin resistance index homeostasis model assessment [IRI_{HOMA}]; Insulin secretion index homeostasis model assessment [ISI_{HOMA}]).

Results

Patients suffering from coronary artery disease tended to have higher total monocyte counts compared to control subjects. In contrast, both patient groups did not differ in cell counts of any monocyte subset. Remarkably, medication at study initiation differed between both groups: 69,2 % patients suffering from coronary artery disease, but only 26,0 % control subjects were on statin treatment.

Furthermore we found an interesting association between markers of obesity and monocyte heterogeneity: CD14⁺CD16⁺ counts correlate with weight, body mass index, waist circumference and insulin resistance. In contrast, neither total monocyte count, nor counts of CD14⁺⁺CD16⁻ or CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes correlate with any marker of obesity.

Conclusion

In contrast to our hypothesis, we did not find increased cell counts of presumably proinflammatory CD16⁺ monocytes in patients suffering from coronary artery disease. Thus, the previously observed association between high CD16⁺ monocyte counts and prevalent cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease may not blindly be transferred to patients with intact renal function. However, we cannot exclude an immunomodulatory impact of statin therapy on monocyte heterogeneity. Therefore, this aspect merits further research.

Nonetheless, we observed a shift towards CD14⁺CD16⁺ monocyte in obesity and insulin resistance, which might points to a regulatory role of proinflammatory cytokines of adipose tissue (adipokines) on monocytic heterogeneity. Future studies should aim to assess the impact of these adipokines on monocytic differentiation.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung der Atherosklerose

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems waren im Jahr 2007 in Deutschland (Statistisches Bundesamt, www.destatis.de) wie auch in anderen westlichen Industrienationen für die Mehrzahl aller krankheitsbedingten Todesfälle verantwortlich. Im Vordergrund stehen hierbei atherosklerotisch bedingte Erkrankungen wie der Myokardinfarkt, der ischämische Schlaganfall oder die peripher arterielle Verschlusskrankheit.

Bis in die 90er Jahre des letzten Jahrhunderts hinein wurde der Prozess der Atherogenese zum überwiegenden Teil als rein passive Lipidakkumulation in der Gefäßwand begriffen und dementsprechend eine Hypercholesterinämie als zentraler Risikofaktor der Atheroskleroseentstehung angesehen, begleitet vom schädigenden Einfluss anderer primärer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und Nikotinkonsum. Im Jahre 1999 postulierte Ross den Einfluss einer weiteren Komponente, die zur Entstehung, Unterhaltung und Progression von atherosklerotischen Plaques beiträgt: die Inflammation (Ross, 1999).

Eine moderne Sichtweise der Atherosklerose (Ross, 1999; Hansson / Libby, 2006) betont den gleichzeitigen und interagierenden Einfluss der Hypercholesterinämie einerseits, der Inflammation andererseits: So gilt eine Erhöhung von oxidiertem LDL-Cholesterin (ox-LDL) als einziger unabhängiger klassischer Risikofaktor, der beim Menschen und in Tiermodellen auch in Abwesenheit anderer klassischer Risikofaktoren die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen fördert (Glass / Witztum, 2001; Skalen et al., 2002). Initial schädigt ox-LDL das Gefäßendothel, worauf die folgende Aktivierung des Endothels zur Bildung von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Integrinen (ICAM [intercellular adhesion molecule] und VCAM [vascular cell adhesion molecule]), von proinflammatorischen Zytokinen und von chemotaktisch wirksamen Molekülen wie z.B. MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) führt. Diese Faktoren bedingen die Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten, insbesondere von Monozyten und Lymphozyten, in die Gefäßwand: So werden Monozyten durch endotheliale Chemokine angelockt, worauf einer reversiblen Bindung („Rolling“) über endotheliale P- und E-Selektine, die feste Bindung der Monozyten über ICAM- und VCAM-Rezeptoren an endothelialen Integrinen der Gefäßwand folgt. Es resultiert schließlich die

Migration von Monozyten in den subendothelialen Raum. Anschließend differenzieren die Monozyten unter Einfluss von M-CSF (macrophage colony stimulating factor) zu Makrophagen, die wiederum Chemokine und Wachstumsfaktoren produzieren, um weitere Monozyten aus der Blutbahn, aber auch glatte Gefäßmuskelzellen aus der Media in den subendothelialen Raum zu locken (Quinn et al., 1987; Rajavashisth et al., 1990; Leonard et al., 1991). Durch Aufnahme von ox-LDL über den Scavenger Rezeptor (CD36) entwickeln sich die Makrophagen schließlich zu Schaumzellen, so dass Monozyten und Makrophagen zu jedem Zeitpunkt in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar sind (Jonasson et al., 1986; van der Wal et al., 1989). Der Prozess fortwährender, sich selbst unterhaltender Inflammation, trägt wesentlich zur Progression atherosklerotischer Plaques bei.

Nach diesem Paradigmenwechsel im Verständnis der Atherosklerose sollten in weiteren Untersuchungen Marker der Inflammation identifiziert werden, die nicht nur den Einfluss der Inflammation belegen, sondern auch einen zusätzlichen Nutzen in der Risikoabschätzung zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse bieten. Ein etablierter, standardisiert messbarer Marker der Inflammation ist das CRP, der erstmals 1997 von Ridker in einer großen Studiengruppe als unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse propagiert wurde (Ridker et al., 1997). Allerdings musste diese Einschätzung in den letzten Jahren teilweise relativiert werden. So zeigten nachfolgende Kohortenstudien (Danesh et al., 2004, Wang et al., 2006a) und eine große Metaanalyse (Danesh et al., 2004), insbesondere nach Korrektur für etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren, eine relativ begrenzte zusätzliche Aussagekraft erhöhter CRP Werte. Insbesondere bietet das CRP im klinischen Alltag nur wenig zusätzliche Informationen bezüglich der Vorhersage zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse (Wang et al., 2006a). In CRP-Genotypisierungsstudien, in denen eine Assoziation zwischen den verschiedenen Genotypen und der Höhe des Serum-CRP nachgewiesen werden konnte, wiesen Probanden mit genetisch determinierter erhöhter CRP Bildung kein erhöhtes Risiko einer beschleunigten subklinischen Atherosklerose oder vorzeitiger kardiovaskulärer Ereignisse auf (Wang et al., 2006b; Zacho et al., 2008). Ein direkter pathophysiologischer Einfluss des CRP auf die Atherogenese muss somit zumindest angezweifelt werden.

Als besserer Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse könnte sich vielmehr die Bestimmung derjenigen Zellen erweisen, die direkt in das komplexe System der Atherogenese involviert

sind und eine unzweifelhafte Relevanz in der Pathogenese besitzen (Hansson et al., 2005). Eine erhöhte Zahl der Gesamtleukozyten geht dementsprechend in mehreren epidemiologischen Studien mit einer höheren Inzidenz für Schlaganfälle und Myokardinfarkte einher (Madjid et al., 2004). Innerhalb der Leukozytensubpopulationen wurde insbesondere für neutrophile Granulozyten eine starke Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko aufgezeigt. Diese Zusammenhänge konnten für Monozyten und Lymphozyten so nicht gezeigt werden (Gurm et al., 2003; Grau et al., 2004; Wheeler et al., 2004; Horne et al., 2005), was vor dem Hintergrund der aktuellen Erkenntnisse der Atheroskleroseentstehung unerwartet erscheint. Grund für diese fehlende Assoziation in epidemiologischen Untersuchungen könnte eine bislang unzureichende Differenzierung der Monozyten in phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulation sein. In einer Arbeit aus dem Jahre 2004 wurden die Gesamtmonozyten zumindest in zwei Subpopulationen unterteilt und es konnte eine Assoziation zwischen einer einzelnen Monozytensubpopulation, $CD14^+CD16^+$ Monozyten, und dem Vorliegen der Koronaren Herzkrankheit (KHK) aufgezeigt werden (Schlitt et al., 2004).

2.2 Biologie der Monozyten

Monozyten entwickeln sich im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen und werden nach ihrer Reifung in die Blutbahn ausgeschwemmt. Monozyten nehmen im peripheren Blut einen Anteil von 5-10 % der Gesamtleukozyten ein und können nach der Auswanderung in periphere Gewebe weiter differenzieren. Einerseits entwickeln sie sich zu Makrophagen, die körperfremde Strukturen phagozytieren können, andererseits differenzieren sie zu Dendritischen Zellen, die in lymphatischen Geweben als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten residieren. Monozyten und Makrophagen sezernieren chemotaktisch wirksame Proteine (Chemokine) und proinflammatorische Zytokine und sind darüber hinaus entscheidend an der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt (Hume et al., 2006). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde schrittweise erkannt, dass Monozyten und Makrophagen nicht als eine homogene Zellpopulation angesehen werden sollten, weil sie sich sowohl in ihren morphologischen, funktionellen und immunphänotypischen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Passlick et al., 1989).

So identifizierten Passlick und Mitarbeiter bereits 1989 innerhalb der Gesamtmonozytenpopulation, die durch Oberflächenexpression des LPS-Rezeptors CD14 definiert wurde, Zellen, die zusätzlich den IgG Fc Rezeptor III (FcγIII-R., CD16) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Zellen weisen morphologisch große Ähnlichkeit mit den klassischen Monozyten auf, die kein CD16 auf ihrer Oberfläche exprimieren (CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten), allerdings ist z.B. die Oberflächenexpression von MHC-II Molekülen zweifach erhöht und die Phagozytoseaktivität deutlich vermindert. Es wurde daraufhin die Existenz einer Monozytensubpopulation postuliert, die eine differente Funktion einnimmt und als CD16⁺ bzw. „CD14⁺CD16⁺ Monozyten“ bezeichnet wurde (Passlick et al., 1989). Erst später unterteilten Ancuta et. al die CD16⁺ Monozyten zusätzlich nach ihrer CD14 Expression und definierten zwei CD16⁺ Populationen, CD14⁺⁺CD16⁺ und CD14⁺CD16⁺, zusätzlich zu der bekannten CD16⁻ Hauptpopulation (CD14⁺⁺CD16⁻) (Ancuta et al., 2003). Diese Einteilung wurde von uns übernommen und in der weiteren Arbeit durchgehend angewendet, während in der Literatur die Bezeichnung „CD16⁺ Monozyten“ teilweise als Sammelbegriff sowohl für CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten und CD14⁺CD16⁺ Monozyten gemeinsam, teilweise aber auch für die jeweilige Einzelpopulation Anwendung findet.

Beim Menschen wurden nach LPS-Stimulation insbesondere für die CD16⁺ Monozyten proinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen im Sinne einer gesteigerten TNF-α und IL-6 Produktion, sowie herabgesetzter IL-10 Expression (Thieblemont et al., 1995; Ziegler-Heitbrock, 1996; Belge et al., 2002). Da bei vielen inflammatorischen Erkrankungen wie Sepsis, HIV-1 Infektion, Tuberkulose und Asthma eine Zunahme dieser zirkulierenden Monozyten beobachtet wurde, bezeichnete die Arbeitsgruppe um Ziegler-Heitbrock diese Subpopulation als proinflammatorische Monozyten (Thieblemont et al., 1995; Ziegler-Heitbrock, 2007).

Die Monozytensubpopulationen unterscheiden sich darüber hinaus deutlich in der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren, die für eine Migration von Monozyten verantwortlich sind. CD16⁻ Monozyten exprimieren vor allem den chemokine attractant receptor 2 (CCR2), der als Rezeptor für das monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1 [CCL2]) fungiert, sowie L-Selektin (=CD62L [leukozytäres Adhäsionsmolekül für Gefäßextravasation]) und nur in geringem Ausmaß den Fraktalkinrezeptor (CX3CR1). Dieser Rezeptor wird im Gegensatz dazu vor allem von CD14⁺CD16⁺ Monozyten exprimiert (Ancuta et al., 2003) und bindet das Chemokin

Fraktalkin, das insbesondere auch in humanen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden konnte (Greaves et al., 2001), während CCR2 und CCR5 nur geringgradig exprimiert werden. Eine interessante Zwischenstellung nehmen die $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten ein, die neben CCR2 und CX3CR1 eine hohe CCR5-Expression (Rezeptor von RANTES = **R**egulated on **A**ctivated **N**ormal **T**-Cell **E**xpressed and **S**ecreted) aufweisen und sich dadurch von den anderen Monozytensubpopulationen unterscheiden.

2.3 Zielsetzung der HOM sweet HOME Studie

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits bei nierentransplantierten Patienten, sowie bei nierengesunden Teilnehmern der I LIKE HOME Studie (622 kardiovaskulär gesunde Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes) die Assoziation zwischen $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten und der Intima Media Dicke (IMT) als Maß der Atherosklerose aufzeigen (Ulrich et al., 2008; Rogacev, 2008). Darüber hinaus wiesen Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten als Prognosemarker kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten nach (Heine et al., 2008).

Es fehlen bislang Untersuchungen, inwieweit eine Subpopulation der Monozyten auch bei nierengesunden Menschen einerseits mit manifesten atherosklerotischen Erkrankungen assoziiert ist, andererseits bei nierengesunden Menschen einen eigenständigen Prognosemarker darstellt. Daher initiierten wir die prospektive **HOM sweet HOME** Studie (Heterogeneity of Monocytes in subjects with coronary heart disease - The Homburg Evaluation), die sich von der I LIKE HOME Studie durch ein höheres Alter und eine relevante kardiovaskuläre Komorbidität der Teilnehmer unterscheidet.

Bei allen Teilnehmern der aktuellen Studie wurde der Koronarstatus im Rahmen einer elektiv durchgeführten Angiographie der Koronararterien überprüft und eine durchflusszytometrische Analyse der Monozytensubpopulationen durchgeführt.

Die folgenden Hypothesen wurden aufgestellt:

- $CD16^{+}$ Monozyten sind in der nierengesunden Allgemeinbevölkerung mit dem Vorliegen der Koronaren Herzkrankheit assoziiert.

- CD16⁺ Monozyten sind in der nierengesunden Allgemeinbevölkerung Prädiktoren zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Materialien sind im Anhang (Kapitel 9.1) tabellarisch aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Klinischer Teil

3.2.1.1 Studiendesign

Es wurden im Rahmen einer prospektiven Längsschnittstudie Patienten rekrutiert, die zu einer elektiven Koronarangiographie im Universitätsklinikum des Saarlandes stationär aufgenommen wurden. Bei der Aufnahme in der Ambulanz der Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin (Direktor Prof. Dr. Michael Böhm) wurde den Patienten unsere Studie vorgestellt und die Möglichkeit einer Teilnahme erläutert.

Die folgenden Kriterien waren für eine Teilnahme ausschlaggebend.

Einschlusskriterien:

- Alter ≥ 18 Jahre
- Einwilligung nach Aufklärung
- Indikation zur elektiven Koronarangiographie

Ausschlusskriterien:

- Systemische immunsuppressive Therapie
- Aktive Tumorerkrankung

Die vorliegende Dissertation umfasst eine Querschnittsanalyse der ersten 440 Patienten, die im Zeitraum 30.05.2007 bis zum 06.03.2008 in die prospektive Längsschnittstudie aufgenommen wurden. Der Autor dieser Dissertation hat alle Probanden mit freundlicher Unterstützung des Teams der kardiologischen Ambulanz rekrutiert und alle klinischen und experimentellen Untersuchungen selbständig durchgeführt.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

3.2.1.2 Studienablauf

Nach einer ausführlichen Aufklärung im Rahmen der Aufnahme in der Ambulanz der Klinik für Innere Medizin III wurden bei Einverständnis der Probanden ein erweitertes Laborprofil bestimmt und zusätzlich Vollblut in eine 4,7 ml-Lithium-Heparin-Gel-Monovette® und eine 4,7 ml Serum-Gel-Monovette® für die Immunphänotypisierung im Nephrologisch-Immunologischen Labor abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte am Morgen des Tages der koronarangiographischen Untersuchung durch das Team der kardiologischen Ambulanz. Die Blutproben wurden nach Transport in das Labor der Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten bis zur Weiterverarbeitung gekühlt über maximal vier Stunden gelagert.

3.2.1.3 Erhebung des Fragebogens

Mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (Anhang 9.2), der auf einer Übersetzung des WHO Fragebogens zur Erhebung von Angina pectoris und peripher arterieller Verschlusskrankheit basiert (Rose, G. A.; Cardiovascular survey methods, 2nd. Ed. Geneva: WHO, 1982), wurden folgende Patientencharakteristika dokumentiert: Symptome kardiovaskulärer Erkrankungen wie belastungsabhängige Dyspnoe oder pectanginöse Beschwerden, traditionelle Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, Diabetes mellitus und eine familiäre Belastung mit vorzeitigen kardiovaskulären Ereignissen (Herzinfarkt oder Schlaganfall eines Verwandten ersten Grades vor dem 60. Lebensjahr) sowie relevante Vorerkrankungen und die aktuelle Medikation. Die Medikation und Vorerkrankungen wurden

im Anschluss anhand ärztlicher Befunde und Berichte verifiziert. Als Diabetiker klassifiziert wurden Patienten mit selbst berichtetem Diabetes mellitus, mit antidiabetischer Medikation oder mit einer Nüchtern glukose > 126 mg/dl). Als aktive Raucher klassifiziert wurden Patienten, die innerhalb der letzten vier Wochen mindestens eine Zigarette rauchten.

3.2.1.4 Erhebung klinischer Parameter

Größe, Gewicht, Blutdruck und Puls nach 5 Minuten Ruhe wurden am Aufnahmetag durch das Pflegepersonal der kardiologischen Ambulanz gemessen. Der Untersucher hat darüber hinaus den Hüftumfang in Höhe der Trochanter majoris femoris bestimmt sowie den Bauchumfang mittig zwischen dem unteren Rippenbogen und den Cristae iliacae, jeweils während der Inspiration und der Expiration.

3.2.1.5 Labordiagnostik

Im Rahmen des Aufnahme-Laborprofils wurden mittels Standardverfahren (http://www.uniklinikum-saarland.de/de/einrichtungen/kliniken_institute/zentrallabor/referenzwerte) folgende Parameter im Zentrallabor des UKS (Komm. Direktor Prof. Dr. Jürgen Geisel) analysiert:

Differentialblutbild, Triglyceride, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Kreatinin, CRP, HbA1c und Troponin-T. Insulin wurde bei einer Subgruppe von 288 Patienten (65,5%) bestimmt.

3.2.1.6 Der koronarangiographische Befund

Die Koronarangiographie wurde am Tag der stationären Aufnahme in der Klinik für Innere Medizin III – Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin durchgeführt. Die Beurteilung der koronarangiographischen Bilder erfolgte routinemäßig durch den untersuchenden Arzt.

Folgende Gefäßeinengungen wurden als relevante Stenosen interpretiert:

- ≥ 50 -prozentige Einengung des rechten Hauptstammes (RCA) oder eines primären Astes
- ≥ 50 -prozentige Einengung des linken Hauptstamms (LCA)
- ≥ 50 -prozentige Einengung des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) oder eines primären Astes
- ≥ 50 -prozentige Einengung des Ramus circumflexus (CX) oder eines primären Astes

Zur Diagnose der Koronaren Herzkrankheit war mindestens eine relevante Stenose mindestens eines genannten Gefäßsegmentes erforderlich. Entsprechend der Anzahl der stenosierten Koronarsegmente (RCA, LAD, CX jeweils inklusive primärer Äste) wurde die KHK in Grad I, II, oder III klassifiziert. Bei Hauptstammstenose lag definitionsgemäß eine KHK II, bei zusätzlicher Beteiligung der RCA eine KHK III vor.

Wenn keine relevante Stenose in einem der aufgeführten Gefäßstämme vorlag, wurde eine KHK ausgeschlossen.

3.2.2 Immunologisch-experimenteller Teil

3.2.2.1 Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen

Die verschiedenen Zelltypen des peripheren Blutes können nach Größe, Granularität und anhand von antigenen Strukturen auf ihrer Oberfläche unterschieden werden, die gemäß internationaler Klassifikation eingeteilt werden (Cluster of Differentiation, CD). Diese Oberflächenantigene werden durch spezifische fluorochromkonjugierte Antikörper gebunden und nachfolgend mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Monozyten wurden mit Hilfe von vier monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die Gesamtpopulation der Monozyten wird von uns anhand der Expression des kostimulatorischen Faktors CD86 (Ligand von CD28 und CTLA4 / CD152) sowie Größe und Granularität der Zellen definiert. Innerhalb dieser Gesamtpopulation der Monozyten lassen sich anhand der Expressionsdichte des LPS-Rezeptors CD14 und des FC γ III-Rezeptors CD16 Subpopulationen unterscheiden. Als weiterer funktionaler Monozytenmarker wurde die Expression und Mean Fluorescence Intensity (MFI) von oberflächengebundenem Angiotensin Converting Enzyme (ACE), CD143 gemessen.

Bei den fluorochromkonjugierten Antikörpern handelt es sich um murine Antikörper gegen humane Antigene. Tabelle 13 (Anhang 9.1.3) gibt einen Überblick über die verwendeten Antikörper und entsprechende Klone.

Für die Untersuchung von Oberflächenmolekülen von Monozyten mittels Durchflusszytometrie eignet sich eine Oberflächenfärbung aus Vollblut mit nachfolgender Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten. Das angewendete Färbeprotokoll ist als Standardmethode im Nephrologisch-Immunologischen Labor des UKS etabliert:

Unter sterilen Bedingungen werden 100 μ l Vollblut in ein FACS Röhrchen pipettiert und 2 ml FACS Puffer (Tabelle 15 / Anhang 9.1.5) zugegeben. Beide Bestandteile werden mit einem Vortex-Mixer gut vermischt und die Zellsuspension zentrifugiert (5 Minuten, 1300 rpm). Der lösliche Überstand wird mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Im Anschluss wird die in Tabelle 2 angegebene Antikörpermixtur zugesetzt, die Suspension gut vermischt und bei 4°C in Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert.

Durch Zugabe von 2 ml Lysingsolution (Tabelle 15 / Anhang 9.1.5) wird die Färbereaktion gestoppt und die Erythrozyten nach weiteren 12 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Der Überstand wird nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 1300 rpm) abgesaugt und das Pellet mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Die nun gefärbten Leukozyten werden in 200 µl Paraformaldehyd (1%) fixiert, gevortext und bei 4°C bis zur durchflusszytometrischen Messung gelagert.

<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
Anti-CD14 PerCP	4 µl
Anti-CD16 APC	0,5 µl
Anti-CD86 PE	5 µl
Anti-CD143 FITC	10 µl
FACS-Puffer	30,5 µl

Tabelle 2: Verwendete Antikörpermixtur in der Vollblutfärbung.

3.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur schnellen Zählung und Charakterisierung von verschiedenen Zellen mit Hilfe von ausgesandten Lichtsignalen. Synonym wird der Begriff **FACS** für **Fluorescence activated cell sorting** verwendet, der ein geschützter Begriff der Firma BD Biosciences Heidelberg ist.

In Lösung befindliche Zellen werden durch eine Kapillare angesaugt und passieren einzeln in einem Sensormodul einen Laserstrahl. Eine Zelle emittiert daraufhin Streulicht und bei gebundenen fluorochromkonjugierten Antikörpern Fluoreszenzsignale, anhand derer auf Eigenschaften der Zelle geschlossen werden kann. Das Streulicht wird durch die Zellgröße, die Zelloberfläche und die Zellgranularität bestimmt.

Das Vorwärtstreulicht (*FSC*) wird durch die Beugung des Lichts hervorgerufen und ist ein Maß für die relative Größe einer Zelle. Das Seitwärtstreulicht (*SSC*) entsteht durch Brechung des Lichts und ist ein Maß für die relative Granularität bzw. interne Komplexität (Zellkern,

Ribosomen) einer Zelle. Beide Parameter ermöglichen schon eine Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen leukozytären Bestandteilen des Blutes (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten).

Eine genauere Identifizierung und Unterteilung einer Zellspezies, z.B. der Monozyten erfolgt durch fluorochromkonjugierte Antikörper, die gegen Oberflächenantigene der zu untersuchenden Zellen gerichtet sind. Der Oberflächenmarker wird einerseits durch den Anteil an der für diesen Marker positiven Zellen (spezifische Fluoreszenz), andererseits durch die Expressionsdichte auf einer einzelnen Zelle (relative Fluoreszenzintensität) charakterisiert. Durch den Einsatz mehrerer Laser mit verschiedenen Anregungswellenlängen kann die Anzahl der einsetzbaren Fluorochrome und damit die Informationsdichte erhöht werden.

In dieser Arbeit wurde ein 4-Farben-Durchflusszytometriergerät der Firma BD Biosciences eingesetzt (FACS Calibur), mit dem die oben beschriebenen Antikörper detektiert wurden. In Tabelle 13 (Anhang 9.1.3) sind die verwendeten Fluorochrome und die entsprechenden Anregungs- und Emissionsspektren aufgeführt.

Im Anschluss an die oben erläuterte FACS Messung erfolgte eine Kontrollmessung mit Farbstoffen standardisierter Fluoreszenzintensität (Sphero Rainbowbeads® der Firma BD Biosciences), um Änderungen der Sensitivität der Sensormodule erkennen zu können. Sphero Rainbowbeads® bestehen aus einer fertigen Mixtur aus Partikeln mit Fluorochromen standardisierter Intensität, mit denen alle Kanäle des Sensormoduls kalibriert werden können. An jedem Untersuchungstag erfolgte jeweils eine Bestimmung der detektierten Fluoreszenzintensität, die jeweils mit der Fluoreszenzintensität am ersten Untersuchungstag in Relation gesetzt wurde. Diese Relation diente als Korrekturfaktor für die erfasste mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), um gerätebedingte Variationen der Detektion zu berücksichtigen. Im Verlaufe der elfmonatigen Messungen trat eine maximale Streuung des Korrekturfaktors von 0,79-1,32 auf, der Mittelwert der Korrekturfaktoren betrug $1,00 \pm 0,24$.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse werden in einem Dotplot dargestellt, in dem ein Punkt einer gemessenen Zelle entspricht und jede Zelle hinsichtlich der Größe, der Granularität oder der Expression eines Oberflächenantigens charakterisiert ist. Die Identifizierung der Monozyten erfolgt durch einen Antikörper gegen den panmonozytären Marker CD86, dessen

spezifische Fluoreszenz in einem Plot gegen die relative Granularität (CD86 versus SSC) aufgetragen wird (Abb.1). Im Anschluss erfolgt das Gating der Monozyten als nachrangiges Kriterium nach Größe (Abszisse) und Granularität (Ordinate) im FSC versus SSC Plot (Abb.2), wobei nur CD86 positive Zellen eingeschlossen werden („Backgating“). Dies ermöglicht den Einschluss von Monozyten im äußeren Bereich der Zellwolke und eine Abgrenzung z.B. gegen die Lymphozytenwolke.

Die so definierte Gesamtmonozytenpopulation wird in einem gesonderten Dotplot (Abb.3) dargestellt, in dem die Expressionsdichte von CD14 auf der Ordinate und von CD16 auf der Abszisse aufgetragen ist. Es zeigt sich ein heterogenes Bild, so dass nicht mehr von einer einheitlichen Monozytenpopulation ausgegangen werden konnte, sondern mit Hilfe der Gatingstrategie Subpopulationen von einander abgegrenzt wurden.

In dieser Arbeit wurden drei Subpopulationen von einander unterschieden:

- Hohe CD14 Expression, geringe CD16 Expression = $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten
- Hohe CD14 Expression, hohe CD16 Expression = $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten
- Niedrige CD14 Expression, hohe CD16 Expression = $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten

Abb.1: Dotplot CD86 versus SSC

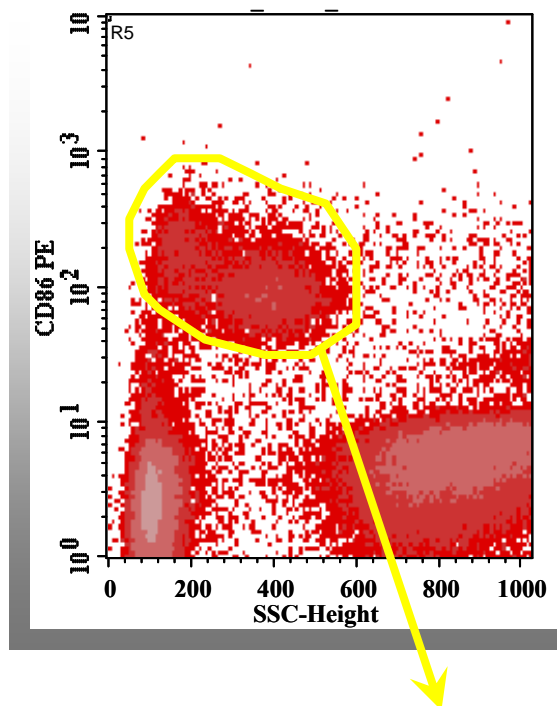


Abb.2: Dotplot SSC versus FSC

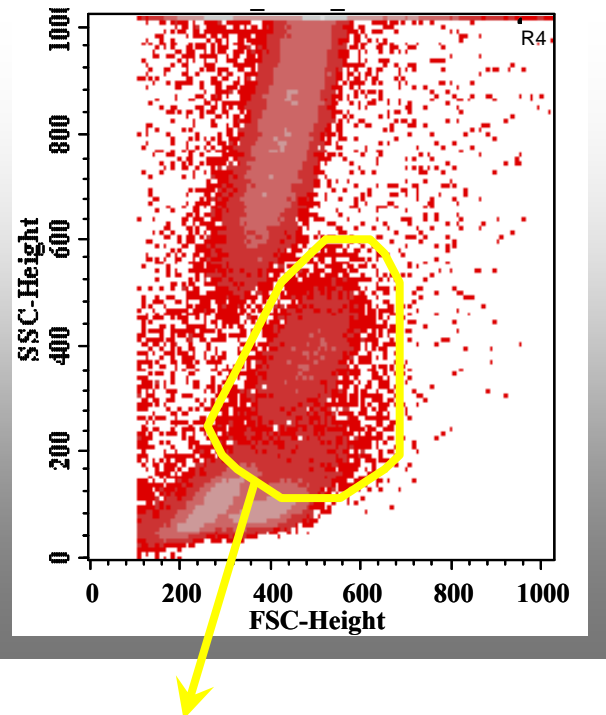
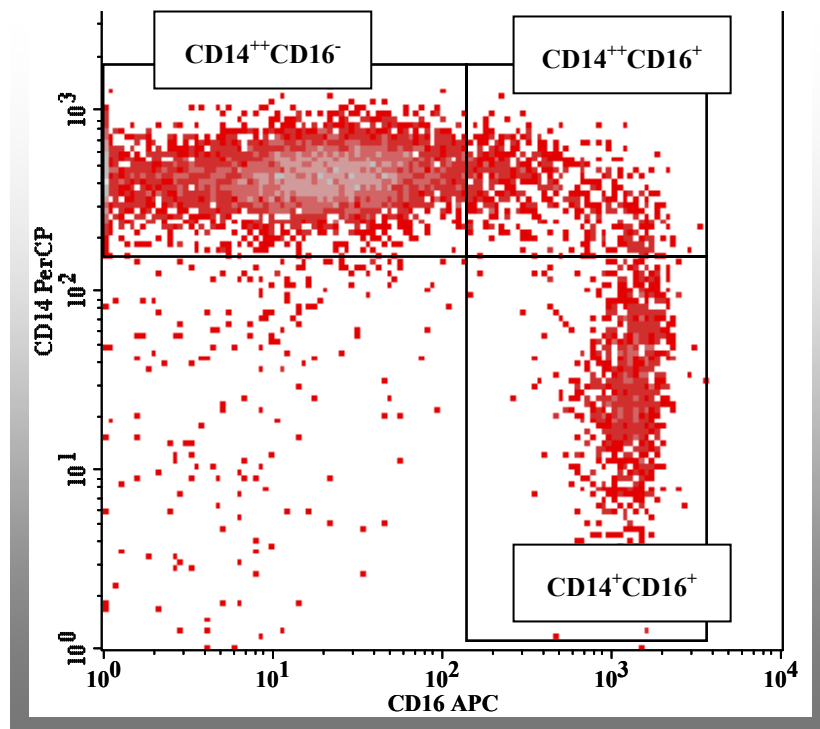


Abb.3: Monozyten nach Oberflächenexpression von CD14 und CD16



Die Schnittmenge der Monozyten innerhalb der oben dargestellten Gates (Abb. 1 und 2) bildet die Gesamtpopulation. Diese wird in Abbildung 3, nach CD14 und CD16 Expression aufgetrennt, dargestellt. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.

3.2.3 Statistische Methoden

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben und mittels Mann-Whitney-Test (zwei ungepaarte Variable), ANOVA Test (mehr als zwei ungepaarte Variable) respektive gepaartem T-Test (zwei gepaarte Variable) verglichen. Nominale Variablen werden als prozentuale Anteile der Grundgesamtheit angegeben und mittels Chi Quadrat Test verglichen.

Zusammenhänge zwischen kontinuierlichen Variablen wurden mittels Spearman-Rho Rangkorrelation überprüft.

Das Signifikanzniveau aller Test wurde bei 5 % festgesetzt. Die statistische Datenverarbeitung erfolgte mittels SPSS 13.0 (SPSS Inc., USA).

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika des Gesamtkollektivs

440 untersuchte Probanden wurden in die statistische Auswertung eingeschlossen. In Tabelle 3 sind die klinischen, laborchemischen und immunphänotypischen Parameter des Gesamtkollektivs dargestellt. Der Anteil aktiver Raucher im Gesamtkollektiv betrug 13,9 %, 38,4 % wiesen einen Diabetes mellitus auf und 34,5 % gaben eine familiäre Prädisposition an.

	<u>Mittelwert</u>	<u>Minimum</u>	<u>Maximum</u>
Alter (Jahre)	65,3 ±10,6	30	86
Gewicht (kg)	82,3 ±15,7	43	140
Größe (cm)	170,2 ±8,5	143	198
Body-Mass-Index (kg/m ²)	28,4 ±4,7	17,0	44,1
Systolischer Blutdruck (mmHg)	143,7 ±21,1	100	210
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	82,0 ±11,5	50	140
Hüftumfang (cm)	102,3 ±10,6	79	155
Bauchumfang Inspiration (cm)	100,0 ±12,8	64	160
Bauchumfang Expiration (cm)	100,7 ±12,8	64	160
CRP (mg/l)	3,8 ±6,2	<0,6	73,3
Serumkreatinin (mg/dl)	1,0 ±0,4	0,5	4,4
HbA1c (%)	6,2 ±1,0	4,5	11,3
Gesamtcholesterin (mg/dl)	183,4 ±42,7	75	332
Triglyceride (mg/dl)	158,4 ±132,2	34	1986
LDL-Cholesterin (mg/dl)	109,8 ±37,5	32	238
HDL-Cholesterin (mg/dl)	50,1 ±14,8	18	128

	<u>Mittelwert</u>	<u>Minimum</u>	<u>Maximum</u>
Gesamtleukozyten / μ l	6604 \pm 2132	2400	31000
Gesamtmonozyten / μ l	549 \pm 189	232	1677
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Monozyten / μ l	446 \pm 165	137	1525
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Monozyten / μ l	38 \pm 20	8	119
CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten / μ l	65 \pm 34	2	227
MFI CD143 (CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Monozyten)	33,5 \pm 17,4	8,2	177,4
MFI CD143 (CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Monozyten)	52,9 \pm 28,3	12,2	224,0
MFI CD143 (CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten)	39,9 \pm 18,8	10,0	124,9

Tabelle 3: Charakteristika aller 440 Patienten, die an der Untersuchung teilgenommen haben.

4.2 Stratifikation anhand des koronarangiographischen Befundes

Die Kohorte wurde anhand des aktuellen koronarangiographischen Befundes nach folgenden Kriterien in zwei Gruppen eingeteilt.

- Manifeste KHK: mindestens eine gesicherte ≥ 50 %ige Stenose in einem der koronaren Hauptgefäße (A. coronaria dextra, RCA; A. coronaria sinistra, LCA; Ramus interventricularis anterior, LAD; Ramus circumflexus, CX) oder in einem primären Ast.
- Ausschluss KHK: keine Stenose oder maximal < 50 % ige Stenose in den koronaren Hauptgefäßen oder in einem primären Ast.

132 Patienten ohne relevanten Verschluss einer Koronararterie bilden die Gruppe „Ausschluss KHK“. Die Gruppe „Manifeste KHK“ mit insgesamt 308 Patienten setzt sich aus 47 Patienten mit KHK I, 103 Patienten mit KHK II und 158 Patienten mit KHK III zusammen. Eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Schweregrade der KHK führte zu keiner relevanten Änderung der Studienergebnisse, so dass die folgenden Auswertungen auf den Vergleich „Manifeste KHK“ versus „Ausschluss KHK“ fokussieren.

Tabelle 4 fasst die Unterschiede bezüglich der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, der Laborparameter und der Monozytensubpopulationen für diese beiden Patientengruppen zusammen.

	<u>Gesamt</u>	<u>Ausschluss</u> <u>KHK</u>	<u>Manifeste</u> <u>KHK</u>	<u>p-Wert</u>
Probanden (n)	440	132	308	
Alter (Jahre)	65,3 ±10,6	63,1 ±11,9	66,3 ±9,9	0,023*
Gewicht (kg)	82,3 ±15,7	81,1 ±16,7	82,9 ±15,3	0,273
BMI (kg/m ²)	28,4 ±4,7	28,2 ±5,1	28,4 ±4,5	0,682
RR systolisch (mmHg)	143,7 ±21,1	141,6 ±20,3	144,6 ±21,4	0,196
RR diastolisch (mmHg)	82 ±11,5	82,5 ±10,8	81,8 ±11,8	0,534
Hüftumfang (cm)	102,3 ±10,6	102,2 ±11,6	102,3 ±10,2	0,792
Bauchumfang Inspiration (cm)	100,0 ±12,8	97,6 ±13,2	101,1 ±12,6	0,015*
Bauchumfang Expiration (cm)	100,7 ±12,8	98,3 ±13,2	101,7 ±12,5	0,015*
Hip to Waist Ratio	1,03 ±0,08	1,05 ±0,09	1,02 ±0,08	<0,001*
Kreatinin (mg/dl)	1,0 ±0,4	0,9 ±0,3	1,1 ±0,4	<0,001*
Harnstoff (mg/dl)	43,1 ±17,3	40,5 ±17,6	44,2 ±17,0	0,004*
Gesamteiweiß (g/l)	75,4 ±4,6	75,5 ±4,8	75,4 ±4,5	0,618
CRP (mg/l)	3,8 ±6,2	4,1 ±5,8	3,7 ±6,3	0,740
HbA1c (%)	6,2 ±1,1	5,9 ±1,0	6,3 ±1,0	<0,001*
Gesamtcholesterin (mg/dl)	183,4 ±42,7	198,9 ±40,2	176,8 ±42,1	<0,001*
Triglyceride (mg/dl)	158,4 ±132,2	131,8 ±69,2	168,5 ±150,3	0,027*
LDL-Cholesterin (mg/dl)	109,8 ±37,5	123,2 ±36,0	104,0 ±36,7	<0,001*
HDL-Cholesterin (mg/dl)	50,1 ±14,8	55,2 ±15,1	48 ±14,2	<0,001*
Statintherapie (%) ⁽¹⁾	56,3	26,0	69,2	<0,001*
Leukozyten /µl	6604 ±2132	6460 ±1681	6667 ±2298	0,448
Gesamtmonozyten /µl	549 ±189	529 ±195	558 ±186	0,061

(1) für 4,6 % der Patienten lag keine valide Information zu einer Statintherapie vor.

	<u>Gesamt</u>	<u>Ausschluss</u> <u>KHK</u>	<u>Manifeste</u> <u>KHK</u>	<u>p-Wert</u>
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Monozyten / μ l	446 \pm 165	429 \pm 173	453 \pm 161	0,060
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Monozyten / μ l	38 \pm 20	37 \pm 20	38 \pm 20	0,807
CD14 ⁺ CD16 ⁺ Monozyten / μ l	65 \pm 34	63 \pm 31	67 \pm 36	0,286
Diabetes mellitus (%)	38,4	25,0	44,2	<0,001*
Nikotin (%)	13,9	15,2	13,3	0,652
Familiäre Belastung (%)	34,5	31,8	35,7	0,446
männliches Geschlecht (%)	66,1	47,7	74,0	<0,001*

Tabelle 4: Vergleich zwischen der Gesamtpopulation, der Gruppe Manifeste KHK und Ausschluss KHK bezüglich kardiovaskulären Risikofaktoren, Laborparametern und Monozyten.

4.3 Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren

Der Vergleich zwischen der Gruppe „Ausschluss KHK“ und „Manifeste KHK“ zeigt, dass Patienten mit Koronarer Herzkrankheit um durchschnittlich 3,2 Jahre älter sind. Das Alter der Teilnehmer der Studie variierte zwischen 30 und 86 Jahren, somit bildet die Untersuchung einen großen Altersquerschnitt ab. In der KHK-Gruppe zeigen sich ein höherer Anteil männlicher Patienten, und eine höhere Prävalenz des Diabetes mellitus (DM). Entsprechend war der HbA1c-Wert als Langzeitparameter einer Störung des Zuckerstoffwechsels in der KHK-Gruppe hochsignifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Der bei Aufnahme gemessene Blutdruck unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant. Der systolische Wert in der KHK-Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell erhöht, der diastolische tendenziell vermindert. Auch bezüglich einer familiären

Prädisposition konnte zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Anteil aktiver Raucher unterschied sich nicht signifikant zwischen der KHK-Gruppe und der Kontrollgruppe.

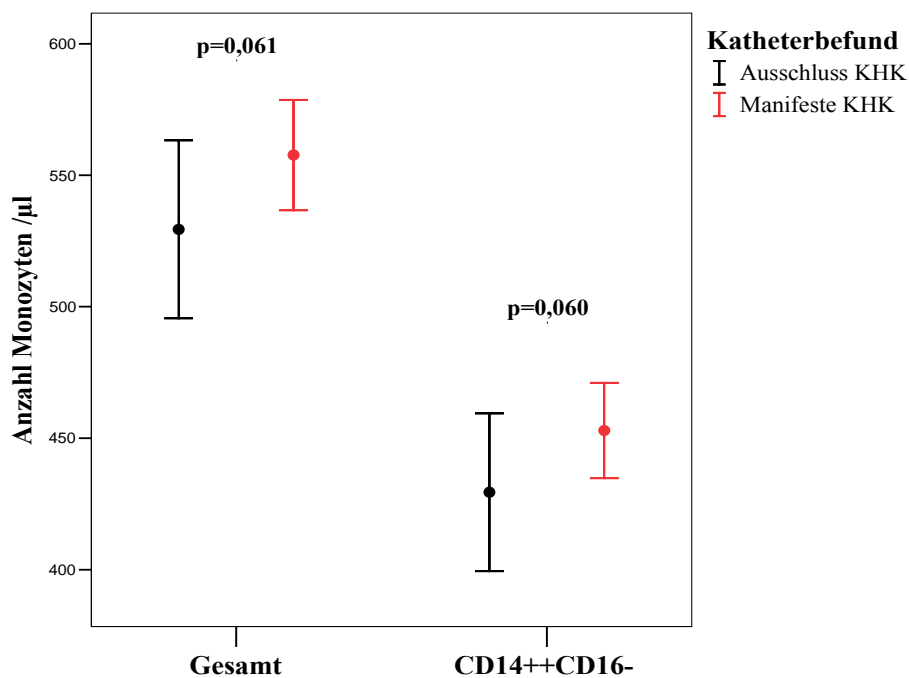
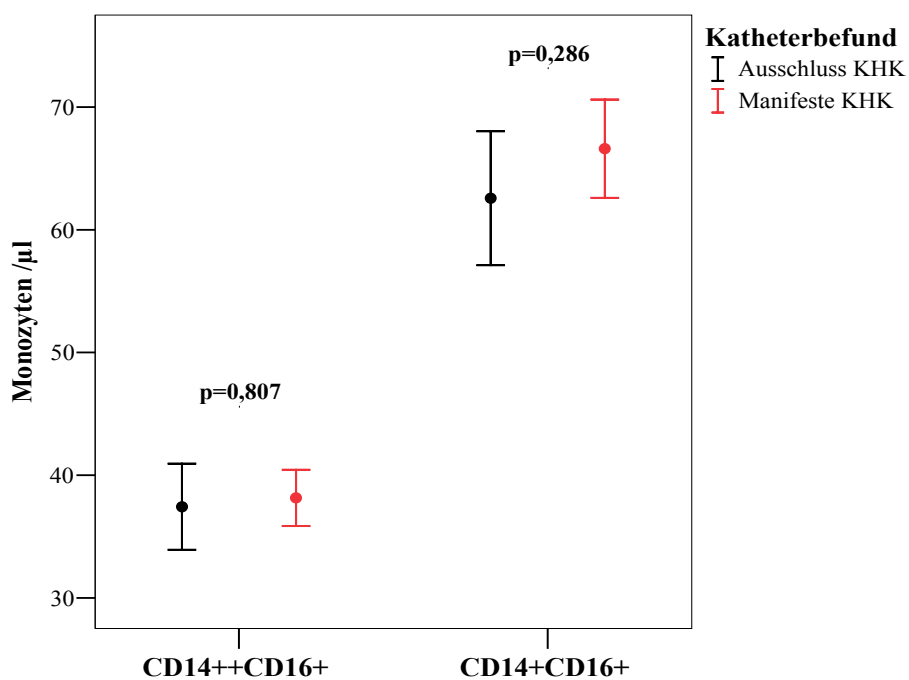
Obwohl kein signifikanter Unterschied bezüglich des Body Mass Index, des Gewichtes und des Hüftumfanges der untersuchten Patienten beider Gruppen festgestellt wurde, so wiesen die Patienten der KHK-Gruppe jedoch einen signifikant größeren Bauchumfang auf. Es resultiert ein hochsignifikant ungünstigeres Verhältnis zwischen Bauch- und Hüftumfang bei den Patienten der KHK-Gruppe. Die Triglyceride sind erwartungsgemäß bei Patienten mit einer KHK signifikant erhöht und das HDL-Cholesterin erniedrigt. Das Gesamtcholesterin und das LDL-Cholesterin sind allerdings in der Kontrollgruppe höher als in der KHK-Gruppe. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einem höheren Anteil von Patienten in der KHK-Gruppe, die zum Untersuchungszeitpunkt mit einem HMG-CoA-Reduktaseinhibitor (Statin) behandelt wurden.

Kreatinin ($p < 0,001$) und Harnstoff ($p = 0,004$) als Parameter der Nierenfunktion waren in der KHK-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Allerdings liegen die Mittelwerte beider Parameter im oberen Referenzbereich (Kreatinin Mann: 0,7-1,2 mg/dl; Kreatinin Frau: 0,5-0,9 mg/dl; Harnstoff: 10-50 mg/dl), so dass auch in der KHK-Gruppe bei der Mehrzahl der Patienten nicht von einer wesentlich eingeschränkten Nierenfunktion ausgegangen werden kann.

4.4 Die Monozytensubpopulationen in der KHK

Die Gesamtzahl der Monozyten war in der KHK-Gruppe tendenziell erhöht, das Signifikanzniveau wurde allerdings verfehlt ($p = 0,061$). Da ca. 80 % aller Monozyten $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten sind, ist diese Subpopulation bei Patienten mit manifester KHK ebenso tendenziell erhöht ($p = 0,060$). Die $CD16^{+}$ Subpopulationen unterschieden sich nicht zwischen KHK Patienten und Kontrollen (Abb. 5 und 6).

Auch eine Subgruppenanalyse aller männlichen Patienten erbrachte keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Monozytenpopulationen zwischen der Kontroll- und der KHK-Gruppe.

Abbildung 5: Gesamtmonozyten und CD14⁺⁺CD16⁻ MonozytenAbbildung 6: CD14⁺⁺CD16⁺ und CD14⁺CD16⁺ Monozyten

In Abbildung 5 und 6 sind jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

4.5 Korrelationen zwischen Monozyten(subpopulationen) und kardiovaskulären Risikofaktoren

	Status KHK	Gesamt / μ l	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ / μ l	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ / μ l	CD14 ⁺ CD16 ⁺ / μ l
Alter (Jahre)	Manifest	-0,023	-0,070	0,120*	0,109
	Ausschluss	0,032	0,009	0,115	0,073
Gewicht (kg)	Manifest	0,035	0,016	-0,047	0,117*
	Ausschluss	0,137	0,074	0,191*	0,214*
RR (mmHg) systolisch	Manifest	-0,005	-0,021	0,026	0,079
	Ausschluss	-0,016	-0,061	0,054	0,173*
CRP (mg/l)	Manifest	0,239**	0,216**	0,270**	0,065
	Ausschluss	0,221*	0,147	0,254**	0,259**
Gesamtcholesterin (mg/dl)	Manifest	-0,035	-0,045	-0,010	0,011
	Ausschluss	-0,045	-0,003	-0,070	-0,120
Triglyceride (mg/dl)	Manifest	0,101	0,076	0,086	0,131*
	Ausschluss	0,055	0,005	0,133	0,238**
LDL-Cholesterin (mg/dl)	Manifest	-0,034	-0,037	-0,009	-0,017
	Ausschluss	0,032	0,065	-0,031	-0,050
HDL-Cholesterin (mg/dl)	Manifest	-0,142*	-0,144*	-0,087	-0,042
	Ausschluss	-0,236**	-0,179*	-0,243**	-0,324**

Tabelle 5: Korrelationen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Monozyten(subpopulationen) nach Stratifikation hinsichtlich prävalenter Koronarer Herzkrankheit (Patienten mit manifester KHK vs Patienten mit Ausschluss KHK).

Angegeben sind der Korrelationskoeffizient (r) und das Signifikanzniveau (p): * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001

	Statin- therapie	Gesamt / µl	CD14⁺⁺CD16⁻ / µl	CD14⁺⁺CD16⁺ / µl	CD14⁺CD16⁺ / µl
Alter (Jahre)	Ja	-0,013	-0,034	0,082	0,043
	Nein	-0,004	-0,053	0,108	0,119
Gewicht (kg)	Ja	0,012	-0,020	0,047	0,111
	Nein	0,099	0,082	0,022	0,194*
RR (mmHg) systolisch	Ja	-0,054	-0,064	0,005	0,079
	Nein	-0,023	-0,044	0,034	0,130
CRP (mg/l)	Ja	0,256**	0,225**	0,285**	0,098
	Nein	0,207*	0,153*	0,234**	0,200**
Gesamtcholesterin (mg/dl)	Ja	0,036	0,041	-0,007	0,008
	Nein	-0,128	-0,119	-0,147	-0,041
Triglyceride (mg/dl)	Ja	0,107	0,079	0,132*	0,143*
	Nein	0,048	0,015	0,066	0,228**
LDL-Cholesterin (mg/dl)	Ja	0,048	0,066	-0,026	-0,035
	Nein	-0,091	-0,084	-0,125	0,003
HDL-Cholesterin (mg/dl)	Ja	-0,114	-0,102	-0,092	-0,084
	Nein	-0,227**	-0,214**	-0,208**	-0,194**

Tabelle 6: Korrelationen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Monozyten(subpopulationen) nach Stratifikation hinsichtlich Statintherapie.

Angegeben sind der Korrelationskoeffizient (r) und das Signifikanzniveau (p): * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001

		Gesamt / µl	CD14⁺⁺CD16⁻ / µl	CD14⁺⁺CD16⁺ / µl	CD14⁺CD16⁺ / µl
Diabetes mellitus	Ja	565±191	459±165	40±20	67±34
	Nein	539±188	438±164	37±20	64±34
	p-Wert	0,093	0,109	0,045	0,375
Aktueller Nikotinkonsum	Ja	635±178	537±156	43±19	55±30
	Nein	536±188	432±162	37±20	67±35
	p-Wert	0,001	0,001	0,003	0,016
Geschlecht	männlich	561±190	458±166	37±20	65±35
	weiblich	528±186	423±180	39±21	65±32
	p-Wert	0,023	0,009	0,218	0,806

Tabelle 7: Monozytenzahl in Abhängigkeit von Diabetes mellitus, aktuellem Nikotinkonsum und Geschlecht.

Das CRP als klinisch etablierter Entzündungsmarker korreliert sowohl bei Probanden mit manifester KHK als auch bei Probanden ohne KHK mit der Anzahl der Gesamtmonozyten, am deutlichsten mit den CD14⁺⁺CD16⁺ Monozytenzahlen. Die Korrelation bleibt auch unter Statintherapie für die CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten erhalten.

Während Gesamt- und LDL- Cholesterin nicht mit den Monozytenzahlen korreliert sind, weisen Triglyceride eine Korrelation mit CD14⁺CD16⁺ Monozyten auf. HDL-Cholesterin korreliert bei Patienten ohne KHK und ohne Statintherapie negativ mit der Anzahl der Monozyten, ohne dass eindeutige Unterschiede in Assoziation mit einzelnen Subpopulationen bestehen.

Nikotinkonsum führt zu deutlichen Veränderungen im Monozytenprofil. Raucher weisen hoch signifikant mehr Gesamt-, CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten auf, wohingegen die Anzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten vermindert ist.

Patienten mit einem Diabetes mellitus weisen tendenziell mehr Gesamtmonozyten auf, wobei der Unterschied hinsichtlich der $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten formal Signifikanzniveau erreicht.

Männliche Patienten haben insgesamt mehr Gesamt- und $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten als weibliche Patienten, während die Zahl der $CD16^{+}$ Monozyten nicht zwischen Männern und Frauen differiert.

Nur $CD16^{+}$ Monozyten korrelieren positiv mit dem Körpergewicht, in der KHK-Gruppe ausschließlich die $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten. Diese Korrelation ist unter Statintherapie nicht mehr nachweisbar. Korrelationen zwischen Markern der Adipositas und $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten sind im Folgenden ausführlich dargestellt.

4.6 Adipositas und Monozyten

4.6.1 Anzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten korreliert positiv mit Body Mass Index und Bauchumfang

Abbildung 7a) Korrelation BMI und CD14⁺CD16⁺ Monozyten

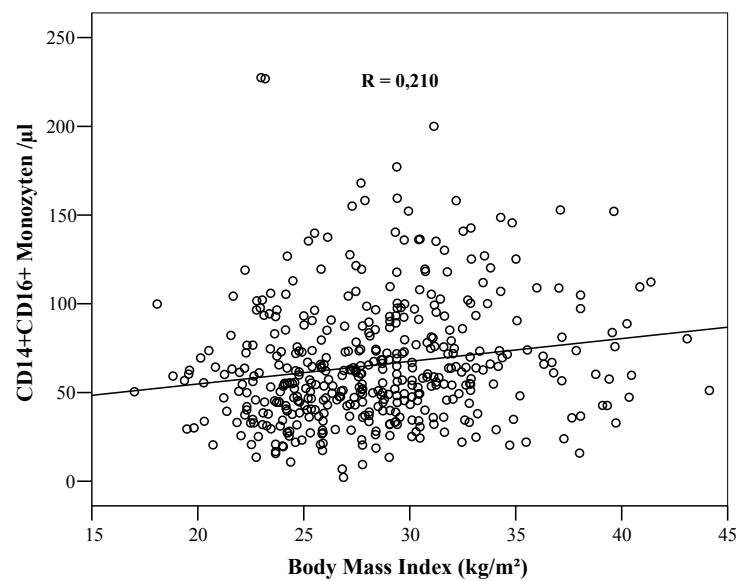
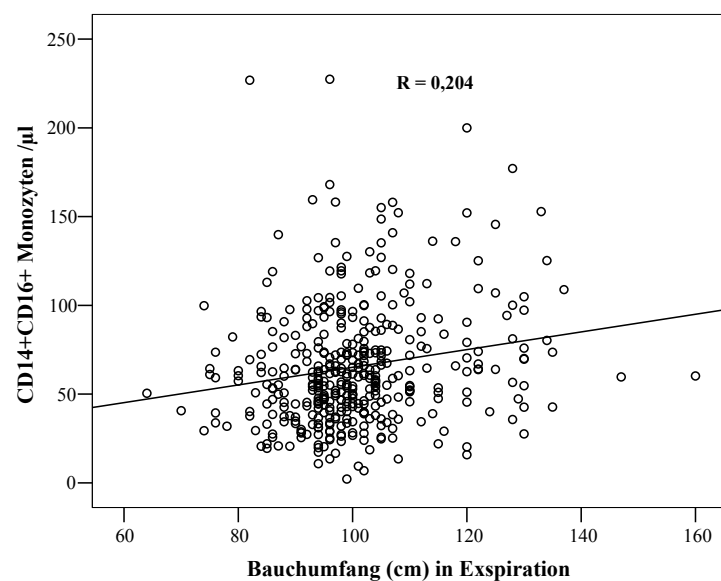


Abbildung 7b) Korrelation Bauchumfang und CD14⁺CD16⁺ Monozyten



Von den untersuchten Subpopulationen der Monozyten konnte für die $CD14^+CD16^+$ Monozyten eine positive Korrelation mit einem erhöhten BMI aufgezeigt werden ($r=0,210$, $p<0,001$), Abbildung 7a). Dieser Zusammenhang besteht nur für diese Monozytenpopulation und ist weder für die Gesamtpopulation ($r=0,054$, $p=0,261$) noch eine andere Subpopulation nachweisbar.

Auch der Bauchumfang (exspiratorisch und inspiratorisch gleichermaßen) als klinisch messbarer Parameter des bedeutsamen abdominalen Fettes korreliert nur mit den $CD14^+CD16^+$ Monozyten ($r=0,204$, $p<0,001$), Abbildung 7b). Vor diesem Hintergrund erscheint eine differenzierte Betrachtung einzelner Monozytensubpopulationen zwingend erforderlich.

4.6.2 Stratifikation für einen pathologischen Body Mass Index und Bauchumfang zeigt einen Anstieg ausschließlich der $CD14^+CD16^+$ Monozyten

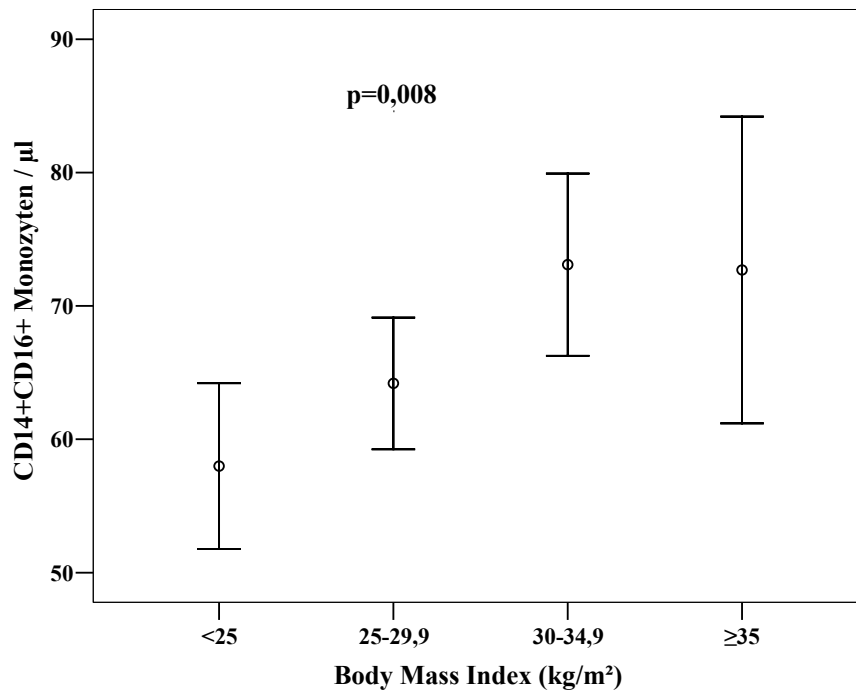
4.6.2.1 Body Mass Index

Die Patienten wurden nach ansteigendem Body Mass Index von Normalgewicht bis zu Adipositas Grad III in vier vordefinierte Kategorien eingeteilt (Tabelle 8). Mit einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) wurde untersucht, ob die Monozytenzahl in der Gesamtpopulation bzw. den Subpopulationen mit zunehmendem BMI ansteigt. Für die $CD14^+CD16^+$ Monozyten konnte ein signifikanter Anstieg (p for trend = 0,008) mit zunehmendem BMI beobachtet werden (Abbildung 8a). Weder für die Gesamtmonozyten noch die anderen Monozytensubpopulationen konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 8b-d)).

	<u>BMI (kg/m²)</u>	<u>Probanden (n)</u>
Normalgewicht	<25.0	117
Präadipositas	25.0-29.9	175
Adipositas Grad I	30.0-34.9	106
Adipositas Grad II und III	≥35.0	36

Tabelle 8: Gradeinteilung der Adipositas anhand des Body Mass Index (BMI). Die Adipositas Grad II und III wurde ob geringer Patientenzahl zusammengefasst.

Abbildung 8a) Zahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten steigt mit dem Grad der Adipositas



In Abbildung 8a) bis 8d) sind jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Abbildung 8b) Zahl der Gesamtmonozyten steigt *nicht* mit dem Grad der Adipositas

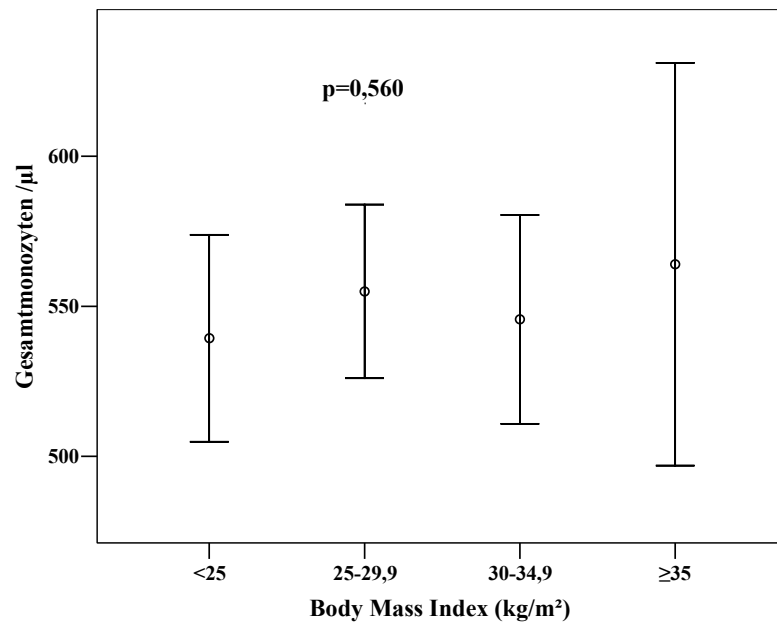


Abbildung 8c) Zahl der CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten steigt *nicht* mit dem Grad der Adipositas

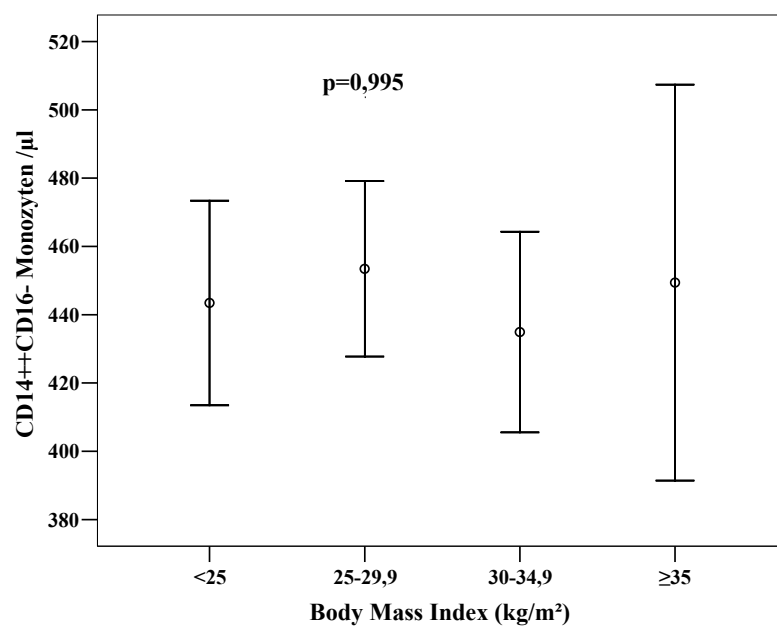
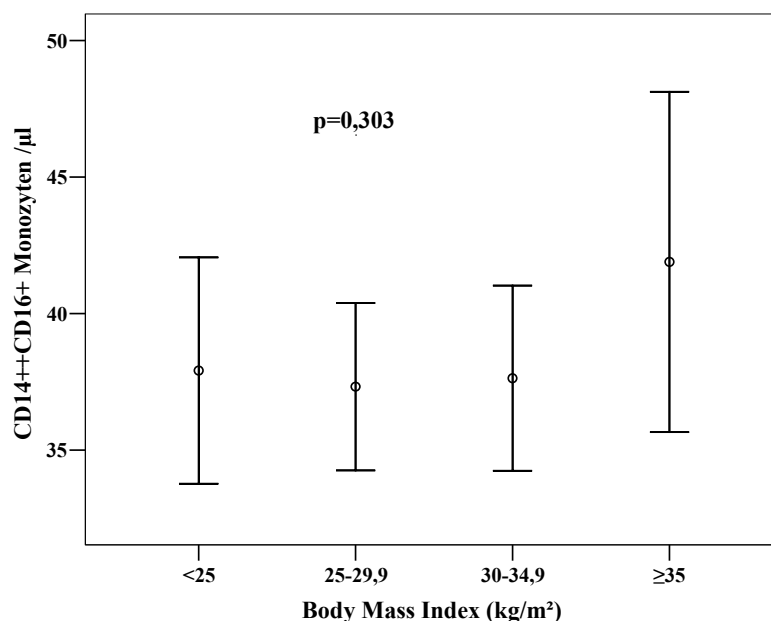


Abbildung 8d) Anzahl $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten steigt *nicht* mit dem Grad der Adipositas



4.6.2.2 Bauchumfang

Neben dem BMI stellt der Bauchumfang ein wichtiges klinisches Kriterium einer Fettstoffwechselstörung und eines erhöhten kardiovaskulären Risikos dar. Beim männlichen Geschlecht gilt ein Bauchumfang ≥ 102 cm und beim weiblichen Geschlecht ≥ 88 cm als pathologisch erhöht (National Cholesterol Education Program [NCEP]; 2001). Anhand dieses Parameters wurden zwei Gruppen gebildet, die hinsichtlich der Monozytensubpopulationen verglichen wurden. $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten sind in der Gruppe mit pathologischem Bauchumfang signifikant zahlreicher als in der Kontrollgruppe (Abb. 9a). Dieser Zusammenhang besteht nicht für die Gesamtmonozyten (Abb. 9b) oder eine andere Subpopulation (nicht dargestellt).

Abbildung 9a) Anzahl CD14⁺CD16⁺ Monozyten und pathologischer Bauchumfang

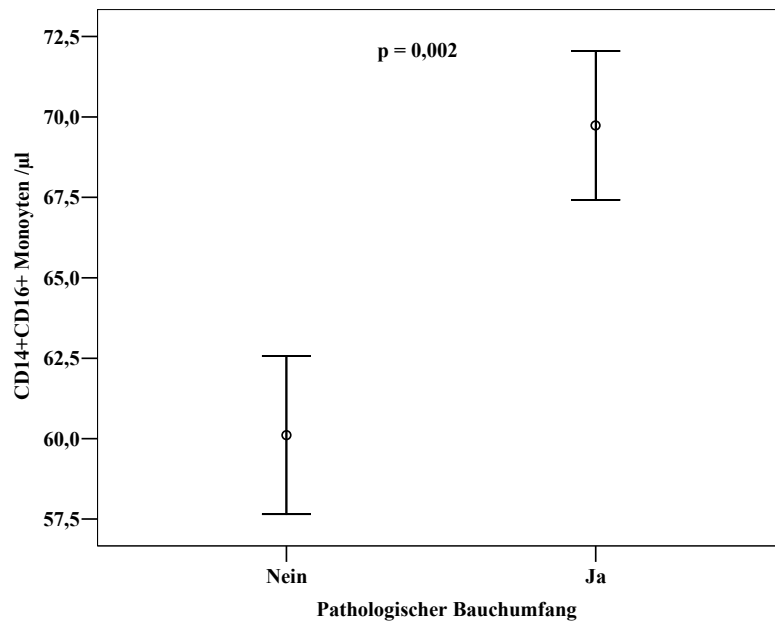
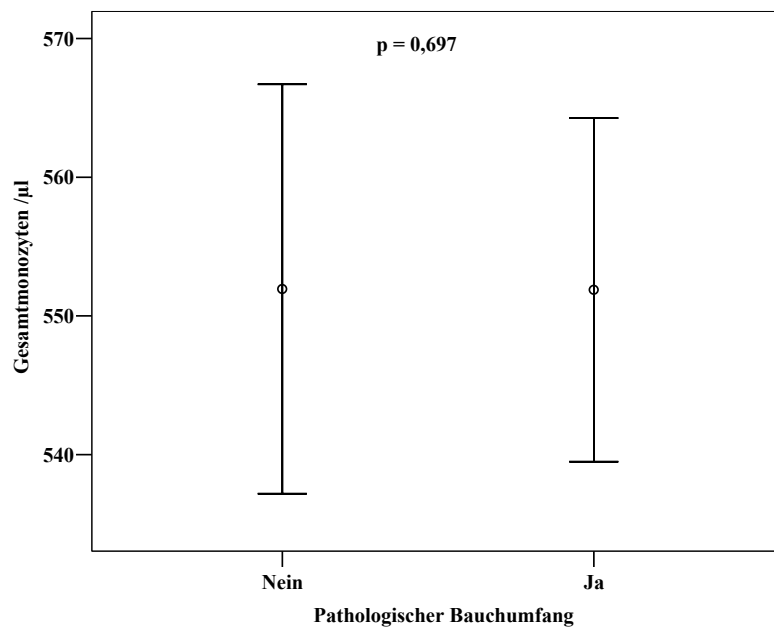


Abbildung 9b) Anzahl Gesamtmonozyten und pathologischer Bauchumfang



In Abbildung 9a) und 9b) sind jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

4.6.3 Insulinresistenz und Monozyten

Eine Insulinresistenz kann mit Hilfe der Laborparameter Nüchterninsulin und Nüchternglukose mit folgenden Formeln berechnet werden (Stumvoll et al., 2000):

- **Insulin resistance index homeostasis model assessment** (IRI_{HOMA}) =

$$\text{Insulin (pmol / l)} \times \text{Glukose (mmol / l)} / 135$$
- **Insulin secretion index homeostasis model assessment** (ISI_{HOMA}) =

$$\text{Insulin (pmol / l)} \times 3,33 / [\text{Glukose (mmol / l)} - 3,5]$$

Bei 170 Patienten des Gesamtkollektivs ohne Diabetes mellitus wurde der Insulinresistenzindex (IRI_{HOMA}) und Insulinsekretionsindex (ISI_{HOMA}) berechnet und mit den Gesamtmonozyten und Subpopulationen verglichen. $CD14^+CD16^+$ Monozyten korrelieren als einzige Population mit der errechneten Insulinresistenz und -sekretion (Tab. 9).

	IRI_{HOMA}		ISI_{HOMA}	
	r	p	r	P
Gesamtmonozyten /μl	0,108	0,165	0,128	0,099
$CD14^{++}CD16^-$ Monozyten /μl	0,074	0,341	0,114	0,142
$CD14^{++}CD16^+$ Monozyten /μl	0,056	0,467	0,029	0,705
$CD14^+CD16^+$ Monozyten /μl	0,210	0,006	0,191	0,013

Tabelle 9: Korrelationen zwischen Messparametern der Insulinresistenz und –sekretion sowie Zellzahlen der Monozyten(subpopulationen).

4.7 Vergleich zwischen Patienten des aktuellen Kollektivs (HOM sweet HOMe) und Probanden einer vorangegangenen Untersuchung (I LIKE HOMe).

Es konnten in dem aktuellen Gesamtkollektiv für die einzelnen Monozytensubpopulationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen „Ausschluss KHK“ und „Manifeste KHK“ nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass die Gruppe „Ausschluss KHK“ nicht einer kardiovaskulär vollkommen gesunden Kontrollgruppe entspricht.

Einerseits beinhaltete diese Gruppe einige Patienten mit beginnender KHK, andererseits kann auch bei Patienten ohne relevante Stenosen der koronaren Hauptgefäße eine systemische Atherosklerose mit Veränderung der peripheren Koronargefäße vorgelegen haben. Zumindest hatten die meisten teilnehmenden Probanden über subjektive Beschwerden im Sinne herabgesetzter Leistungsfähigkeit, pektanginöser Beschwerden oder belastungsabhängiger Dyspnoe geklagt, so dass eine dieser Beschwerden oder pathologische Befunde einer ambulanten kardiologischen Konsultation zu einer koronarangiographischen Abklärung geführt haben.

Es wurde deshalb ein Vergleich mit Daten aus der I LIKE HOMe Studie angestellt, in der 622 gesunde Mitarbeiter des UKS im Rahmen einer betriebsärztlichen Untersuchung hinsichtlich ihres Monozytenprofils immunphänotypisch charakterisiert und ihre Intima Media Dicke (IMT) als Marker subklinischer Atherosklerose bestimmt wurde (Rogacev, 2008)

Um mögliche Einflussvariablen wie das Geschlecht, das Alter und einen Diabetes mellitus auszuschließen, wurden insgesamt 31 Paare gebildet, die jeweils in diesen Variablen übereinstimmten (Alter \pm 2,5 Jahre). Teilnehmer der aktuellen Untersuchung weisen gegenüber den gepaarten I LIKE HOMe Teilnehmern einen höheren BMI, niedrigere Gesamt- und HDL-Cholesterinwerte auf (Tabelle 10).

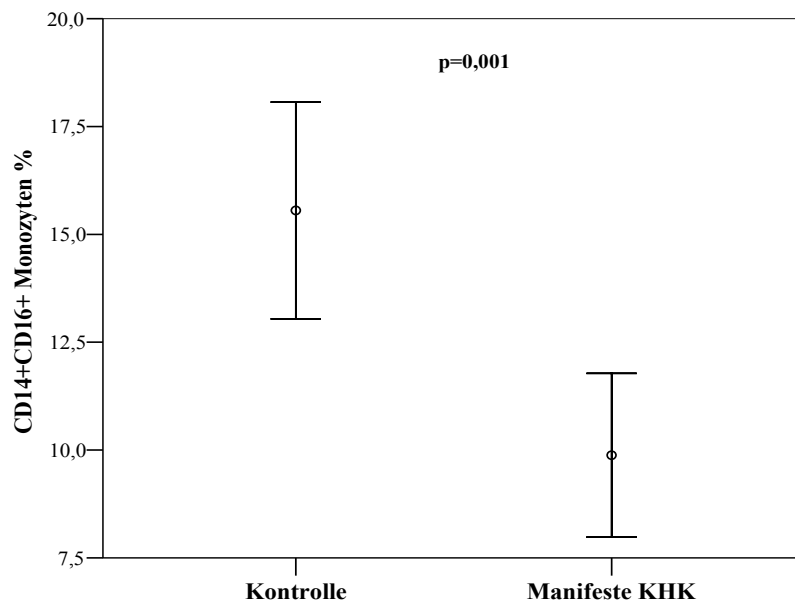
Patienten der KHK-Gruppe weisen tendenziell höhere Gesamtmonozytenzahlen und signifikant mehr CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten auf, während Probanden der Kontrollgruppe tendenziell höhere Zellzahlen der CD14⁺CD16⁺ Monozyten aufweisen. Betrachtet man die relative Verteilung der Monozytensubpopulationen, so resultiert hieraus in der KHK-Gruppe ein signifikant geringerer prozentualer Anteil der CD14⁺CD16⁺ Zellen an allen Monozyten.

Der Anteil der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten unterscheidet sich nicht zwischen der Kontroll- und der KHK-Gruppe.

	<u>Mittelwert</u> <u>Kontrollgruppe</u>	<u>Mittelwert</u> <u>KHK-Gruppe</u>	<u>p-Wert</u>
Body Mass Index (kg / m ²)	26,8 ±4,2	29,7 ±6,0	0,019*
Gesamtcholesterin (mg / dl)	208,8 ±44,0	174,7 ±49,2	0,004*
Triglyceride (mg / dl)	136,8 ±96,1	164,1 ±98,8	0,186
LDL-Cholesterin (mg / dl)	122,7 ±38,8	107,3 ±44,3	0,118
HDL-Cholesterin (mg / dl)	65,1 ±19,4	43,0 ±12,1	<0,001*
Gesamtmonozyten /μl	478 ±161	556 ±191	0,081
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ /μl	377 ±145	465 ±163	0,026*
Monozyten %	77,9 ±7,8	83,6 ±6,0	0,004*
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ /μl	31 ±16	37 ±20	0,223
Monozyten %	6,6 ±2,6	6,5 ±2,1	0,888
CD14 ⁺ CD16 ⁺ /μl	70 ±33	54 ±31	0,075
Monozyten %	15,6 ±6,9	9,9 ±5,2	0,001*

Tabelle 10: Kontrolle (I LIKE HOME) versus KHK (HOM sweet HOME). Paarbildung für die Parameter Alter, Geschlecht und Diabetes mellitus.

Abbildung 10: Anteil CD14⁺CD16⁺ Monozyten in der KHK-Gruppe (HOM sweet HOMe) und der Kontrollgruppe (I LIKE HOMe)



In Abbildung 10 sind jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren

Als traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren werden arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum und Fettstoffwechselstörungen angesehen. Patienten unserer Untersuchung mit einer manifesten KHK weisen gegenüber der Kontrollgruppe vermeintlich überraschenderweise nicht in allen Punkten eine ungünstigere Konstellation hinsichtlich dieser Risikofaktoren auf. Nur der Diabetes mellitus, ein erhöhter Bauchumfang bzw. ein ungünstiges Verhältnis zwischen Bauch- und Hüftumfang als Zeichen vermehrten abdominalen Fettgewebes, sowie erhöhte Triglyceride und ein erniedrigtes HDL-Cholesterin sind in der KHK-Gruppe als ungünstige Einflussfaktoren nachweisbar.

Dies kann einerseits auf eine starke Selektion der rekrutierten Patienten in der Kontrollgruppe zurückgeführt werden, die fast alle aufgrund subjektiver belastungsabhängiger pectanginöser Beschwerden bzw. Dyspnoe oder aufgrund objektiver ärztlicher Befunde angiographiert wurden. Daher können einige Patienten trotz Ausschluss einer makrovaskulären KHK symptomatische mikrovaskuläre Veränderungen aufweisen, die durch eine Angiographie der Koronararterien nicht ausgeschlossen werden (Phan et al., 2009). Die Gruppe mit koronarangiographischem Ausschluss einer relevanten Stenose der proximalen Koronararterien kann demzufolge auch nicht vollkommen koronargesunde Patienten umfassen. Dieser Umstand kann statistisch signifikante Unterschiede verschleiert haben.

Andererseits weisen Patienten mit manifester Koronarer Herzkrankheit eine breite Medikation auf, so dass ehemalige Unterschiede in primären Risikofaktoren, die über Jahrzehnte vor Manifestation der Herzkrankheit auf die Patienten eingewirkt haben, durch pharmakologische Sekundärprävention nivelliert werden.

So kann etwa die nur marginale Differenz hinsichtlich des systolischen (3 mmHg) und diastolischen (0,7 mmHg) Blutdrucks zwischen beiden Gruppen neben der Selektion durch die konsequente medikamentöse Blutdruckeinstellung in der KHK-Gruppe erklärt werden, die in der Regel bereits vor unserer Untersuchung begonnen wurde. Ein aktueller Nikotinkonsum wurde in der KHK-Gruppe sogar tendenziell seltener angegeben, was darauf zurückzuführen ist, dass einigen Patienten der KHK Gruppe bereits ein kardiovaskuläres Ereignis widerfahren

ist, welches einen zusätzlichen Handlungsanreiz zur Beendigung des Nikotinabusus gegeben haben könnte.

Neben der hochsignifikant unterschiedlichen Hip to Waist Ratio und dem Bauchumfang als klinische Parameter einer Adipositas, unterscheiden sich auch die Laborparameter, die hinweisend für eine Fettstoffwechselstörung sein können, zwischen der Kontroll- und KHK-Gruppe. Das verhältnismäßig niedrige HDL-Cholesterin in der KHK-Gruppe sowie das erhöhte Niveau der Triglyceride entsprechen dem typischen Risikoprofil dieser Patienten. Allerdings erscheinen das in der KHK-Gruppe erniedrigte Gesamt- und LDL-Cholesterin widersprüchlich im Kontext des allgemeinen Verständnisses der Atheroskleroseentstehung. In diesem Zusammenhang muss darauf verwiesen werden, dass 69,2 % der Patienten in der KHK-Gruppe bereits zum Untersuchungszeitpunkt mit einem Statinpräparat behandelt wurden (Kontrollgruppe: 26,0%). Statine greifen an verschiedenen Stellen in den Lipidstoffwechsel ein und modulieren dementsprechend die messbaren Parameter im Serum unterschiedlich stark. So senkte 40 mg Simvastatin in einer großen randomisierten Studie mit 4444 Teilnehmern nach sechsmonatiger Therapie am stärksten das LDL-Cholesterin (-38%) und das Gesamtcholesterin (-28%), während der Einfluss auf die Triglyceride (-15%) und das HDL-Cholesterin (+8%) deutlich schwächer ausgeprägt waren (Pedersen et al., 1994). Diese Beobachtung kann den zunächst überraschenden Unterschied in Gesamt- und LDL-Cholesterin zwischen unserer KHK-Gruppe und der Kontrollgruppe erklären, während Triglyceride und das HDL-Cholesterin, welche nicht in diesem Maße durch eine Statintherapie beeinflusst werden, sich erwartungsgemäß zwischen den Gruppen unterscheiden. Darüber hinaus wurden nicht alle Patienten mit demselben Statinpräparat bzw. mit einer einheitlichen Dosis therapiert.

Der hohe Anteil von Patienten mit einem Diabetes mellitus in unserer KHK-Gruppe (44,2% vs 25,0 %) steht in Einklang mit der Rolle des Diabetes mellitus als unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor (Grundy et al., 1999). Als ein weiterer Parameter, der Störungen des Glukosestoffwechsels anzeigen kann, wurde der HbA1c-Wert in der KHK-Gruppe hochsignifikant erhöht nachgewiesen.

5.2 Monozyten und KHK

5.2.1 Monozytensubpopulationen im Kontext vorangegangener Untersuchungen

In unserer Untersuchung unterscheiden sich Patienten mit manifester KHK nicht in der Anzahl der zirkulierenden CD16⁺ Monozyten von Patienten ohne KHK. Diese Ergebnisse widersprechen der von Schlitt et al. (2004) beschriebenen Assoziation zwischen einer erhöhten Anzahl an CD16⁺ Monozyten und prävalenter KHK.

Die Ergebnisse der aktuellen Untersuchung zeigen vielmehr eine tendenziell ($p=0,060$) erhöhte Anzahl an CD16⁻ Monozyten bei prävalenter KHK, was aber im Kontext der tendenziell ($p=0,061$) erhöhten Gesamtmonozyten in der KHK-Gruppe gewertet werden muss. Weil ca. 80% aller Monozyten CD16⁻ Zellen sind, spiegeln sich erhöhte Zahlen der Gesamtmonozyten bei gleicher Verteilung der Monozytensubpopulationen direkt in einer Zunahme der CD14⁺⁺CD16⁻ Zellen.

Allerdings unterscheiden sich beide Untersuchungen in wichtigen Details. Einerseits rekrutierten Schlitt et al. eine Kontrollgruppe gesunder Probanden aus Hausarztpraxen, während in der aktuellen Untersuchung die Kontrollgruppe aus Patienten mit koronarangiographischem Ausschluss der Koronaren Herzkrankheit bestand.

Daneben unterschied sich die laboranalytische Bestimmung der Monozytensubpopulationen: Schlitt et al. differenzierten Monozyten nur anhand ihrer morphologischen Eigenschaften im FSC- und SSC-Scatter von anderen Leukozyten, während in der aktuellen Arbeit alle Monozyten zuerst durch den panmonozytären Marker CD86 selektiert und anschließend im FSC/SSC Plot identifiziert wurden. Hierdurch wurde eine präzisere Auswahl der Monozyten erreicht, während in der Arbeit von Schlitt et al. vermutlich CD16⁺ Monozyten unterrepräsentiert sind, da diese in unmittelbarer Nähe zu Lymphozyten im FSC-/SSC-Scatter zu liegen kommen und somit bei Eingrenzen der präsumtiven Monozytenpopulation nicht erfasst werden. Der zweite wichtige Unterschied betrifft die Differenzierung der Gesamtmonozyten in Subpopulationen. Schlitt et al. differenzierten nur CD16⁻ und CD16⁺ Monozyten (Schlitt et al., 2004), unsere Arbeitsgruppe bildete insgesamt drei Subpopulationen (vgl. 3.2.2.2 und Abb.1-3). Diese Dreiteilung wird inzwischen allgemein

angewendet und spiegelt sich auch in einer divergenten Expression von Zytokinrezeptoren dieser drei Subpopulationen wider (Ancuta et al., 2003).

Um Unterschiede in der Probandenrekrutierung von Unterschieden der durchflusszytometrischen Diagnostik zu differenzieren, verglichen wir Teilnehmer der aktuellen Untersuchung mit hinsichtlich Alter, Geschlecht und Diabetes mellitus gepaarten Teilnehmern der I LIKE HOME Studie, die ausschließlich unselektierte Probanden der Allgemeinbevölkerung untersuchte. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe der aktuellen Untersuchung, welche sich meist aufgrund einer präsumtiven Koronaren Herzkrankheit einer invasiven Koronardiagnostik unterzogen, weisen die meisten Probanden der I LIKE HOME Studie keinerlei Hinweise auf kardiovaskuläre Erkrankungen auf. Auch im Vergleich mit den Probanden der I LIKE HOME Studie weisen die KHK-Patienten der aktuellen Studie, allerdings anders als bei Schlitt et al., keine Zunahme der CD16⁺ Monozyten auf. Vielmehr zeigt sich bei der Analyse der relativen Zellzahlverteilung in der KHK-Gruppe ein verminderter Anteil der CD14⁺CD16⁺ Monozyten an den Gesamtmonozyten.

Somit lässt sich die Diskrepanz zwischen unserer Studie und den Ergebnissen von Schlitt et al. nicht allein auf eine andere Probandenrekrutierung zurückführen, sondern vermutlich auch auf die differenziertere durchflusszytometrische Erfassung der Monozyten, wie oben dargestellt.

Die aktuelle Beobachtung steht aber auch in vermeintlichem Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe. So berichtete Rogacev eine Korrelation zwischen Zellzahlen der CD14⁺CD16⁺ Monozyten und der IMT als Marker der subklinischen Atherosklerose. Allerdings verschwand diese Assoziation nach Korrektur für traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren, während in unserer Subgruppenanalyse durch die Paarbildung der Einfluss einzelner kardiovaskulärer Risikofaktoren eliminiert werden konnte. Außerdem besteht der Unterschied bei den CD14⁺CD16⁺ Monozyten nicht für die absoluten Zellzahlen, so dass der verminderte prozentuale Anteil der CD14⁺CD16⁺ Monozyten in der KHK-Gruppe größtenteils aus einer absoluten Zunahme der CD14⁺⁺CD16⁻ Monozytenzahl resultieren dürfte. Innerhalb der CD16⁺ Monozyten sind in dieser Subgruppenanalyse allerdings die Zellzahlen der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten, anders als die Zellzahlen der CD14⁺CD16⁺ Monozyten, bei Patienten mit manifester KHK tendenziell erhöht, jedoch wird das Signifikanzniveau erneut verfehlt.

Insgesamt wirft diese Subgruppenanalyse eher neue Fragen auf, als dass sie die initialen Fragen beantworten kann. Obwohl jeweils nur ein kleiner Ausschnitt aus beiden großen Kohorten verglichen wurde, gibt die Analyse zumindest Anlass, einen weiteren Fokus auch auf die $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten zu richten, die in den vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nicht mit subklinischen oder manifesten atherosklerotischen Gefäßveränderungen assoziiert waren.

Vielmehr gingen Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe bei nierenkranken Patienten von einer zentralen Bedeutung der $CD14^{++}CD16^{+}$ und der $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten in der Atherogenese aus: Bei Dialysepatienten mit manifesten atherosklerotischen Gefäßerkrankungen konnten nicht nur insgesamt mehr $CD16^{+}$ Monozyten als bei Dialysepatienten ohne Gefäßerkrankungen nachgewiesen werden, sondern die $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten auch als Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten identifiziert werden (Heine et al., 2008). Die $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten waren bei nierentransplantierten Patienten mit subklinischer Atherosklerose (anhand IMT) assoziiert (Ulrich et al., 2008). Natürlich liegt der entscheidende Unterschied zu der aktuellen Arbeit vor allem in der Auswahl schwer nierenkranker Patienten, die in der Arbeit von Heine et al. (2008) zudem deutlich älter (71,0 vs 65,3 Jahre) waren.

Zusammenfassend können diese vorbeschriebenen Assoziationen der $CD16^{+}$ Monozyten mit prävalenten oder inzidenten kardiovaskulären Erkrankungen bei nierenkranken Patienten zunächst nicht auf nierengesunde Menschen übertragen werden, weil in der aktuellen Arbeit keine signifikante Assoziation von Zellzahlen einer einzelnen Monozytensubpopulation mit dem Vorliegen einer KHK beobachtet werden konnte.

Ein verbessertes Verständnis von der Rolle einzelner Monozytensubpopulationen in der Atherosklerose erhoffen wir uns von der prospektiven Nachverfolgung der HOM sweet HOME Studienteilnehmer, die die Frage beantworten wird, ob einzelne Monozytensubpopulationen bei nierengesunden Patienten Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse sind. Für den Schlaganfall, als eine weitere Komplikation fortgeschrittener Atherosklerose, wurde kürzlich eine Relevanz des Monitorings der Monozytensubpopulationen postuliert. So berichteten Urra und Mitarbeiter, dass bei Schlaganfallpatienten eine erhöhte Anzahl von $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten bei Krankenhausaufnahme mit schlechtem neurologischen Outcome, erhöhter Mortalität und

einer frühzeitigen klinischen Verschlechterung assoziiert sei (Urrea et al., 2009). Demgegenüber seien die $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten invers mit der Mortalität und die $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten invers mit der Infarktgröße assoziiert (Urrea et al., 2009). Allerdings ließ sich diese Assoziation nicht reproduzieren, wenn zu anderen Zeitpunkten Monozytensubpopulationen analysiert wurden. Zudem sind die Untersuchungen von Urrea und Mitarbeitern in ihrer Aussage limitiert, da aufgrund der mehrfachen Messzeitpunkte und diversen Endpunkte das statistische Problem des multiplen Testens besteht.

5.2.2 Monozytensubpopulationen in der Atheroskleroseentstehung

Für den Einfluss der $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten auf die Atherogenese spricht die unter allen Monozyten höchste Expression an CCR2 (mehr als 90% aller $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den CCR2; Ancuta et al., 2004), der als Rezeptor für das monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1 / CCL2) fungiert und neben Monozyten noch auf NK-, T-, dendritischen und basophilen Zellen exprimiert wird. MCP-1 wird als wichtigstes Chemokin angesehen, das Monozyten aus dem Blut in frühe humane atherosklerotische Läsionen hinein locken kann und Makrophagen-reiche Plaques entstehen lässt (Charo / Taubmann, 2004). MCP-1 wird von humanen Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand nach Kontakt mit oxidiertem LDL (ox-LDL) produziert (Cushing et al., 1990). MCP-1 wird zudem als potentieller Link zwischen ox-LDL und der Rekrutierung von Schaumzellen in die Gefäßwand angesehen (Charo / Taubmann, 2004). Auch in Mausmodellen konnte die wichtige Rolle von MCP-1 für die Rekrutierung von Monozyten gezeigt werden, wobei sowohl die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen, die Schaumzellformation und die Progression der Atherosklerose von der MCP-1-Expression abhängig ist (Grewal et al., 1997; Gu et al., 1998; Aiello et al., 1999). MCP-1 oder CCR2 defiziente Mäuse sind darüber hinaus vor dem Einwandern von Makrophagen in atherosklerotische Läsionen und dem Wachsen atherosklerotischer Plaques geschützt (Boring et al., 1998; Dawson et al., 1999). Interessanterweise zeigten sich unterschiedliche Effekte zwischen dem Ausschalten von MCP-1 und CCR2, die Ausschaltung des Rezeptors erwies sich als deutlich effektiver in der Prävention z.B. einer Intimahyperplasie bei Mäusen (Charo / Taubmann, 2004). Monozyten sind also ein mögliches Ziel in der Therapie, um direkt auf zellulärer Ebene Rezeptoren zu beeinflussen. Allerdings

sind ebenso CCR2-unabhängige Effekte von MCP-1 auf die Proliferation glatter Muskelzellen beobachtet worden, so dass von einem direkten und indirekten, monozytenvermittelten Einfluss auf die Plaqueentstehung ausgegangen werden kann (Watanabe et al., 2001; Viedt et al., 2002; Schechter et al., 2004).

Neben den $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten wird der CCR2 auch von über 70% der $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten (Ancuta et al., 2004) exprimiert, so dass auch diese Monozyten in der frühen Phase an der Atherogenese beteiligt sein dürften. Darüber hinaus ist ein Kennzeichen dieser Zellen vor allem die im Vergleich zu $CD14^{++}CD16^{-}$ und $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten hohe Expression des CCR5 (Rezeptor von RANTES). Für eine zentrale Rolle von RANTES-CCR5 Interaktionen spricht, dass bei Antagonisierung des Chemokins RANTES (**R**egulated on **A**ctivated **N**ormal **T**-Cell **E**xpressed and **S**ecreted) eine signifikante Abnahme der Plaqueprogression bei Mäusen beobachtet wurde (Veillard et al., 2004). Dies ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert, es legt einerseits eine Beteiligung des CCR5 und CCR1 (hohe Expression auf $CD14^{++}CD16^{-}$ und $CD14^{++}CD16^{+}$) in einer fortgeschrittenen Phase der Plaquebildung nahe und war der erste Nachweis einer möglichen targetbasierten Therapiestrategie in der Atheroskleroseentstehung. Beim Menschen ist ein genetischer Polymorphismus des CCR5 wiederum mit einem geringerem Risiko für einen frühen Myokardinfarkt (Gonzales et al., 2001) bzw. der Entwicklung einer hochgradigen KHK (Szalai et al., 2001) assoziiert. $CD14^{++}CD16^{+}$ Monozyten scheinen also aufgrund ihrer phänotypischen Eigenschaften einerseits und ihrer Beteiligung an verschiedenen Phasen der Bildung von atherosklerotischen Läsionen andererseits eine interessante Zwischenstellung zwischen den $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten und den $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten einzunehmen.

$CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten exprimieren die vorgenannten Chemokinrezeptoren nur rudimentär und sind durch den einzig bekannten Vertreter der CX3C-Rezeptorklasse, den CX3CR1 charakterisiert. Er wird von $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten und T-Zellen exprimiert und bindet das Chemokin Fraktalkin (FKN), das von Monozyten und Endothelzellen in gebundener und löslicher Form produziert wird. In der gebundenen Form wirkt FKN als ein potentes Adhäsionsmolekül, das unter physiologischen Flussbedingungen die Zellbindung am Endothel vermittelt. FKN wird unter normalen Bedingungen und vor allem unter inflammatorischen Bedingungen durch $TNF-\alpha$ und IL-1 Einfluss von Endothelzellen exprimiert (Umehara et al., 2001; Ancuta et al., 2003). Nach Abspaltung des löslichen Chemokinanteils, kann FKN $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen unter

anderem in atherosklerotische Läsionen hinein locken (Charo / Taubmann, 2004). Fraktalkin wurde in humanen atherosklerotischen Läsionen neben anderen Chemokinen nachgewiesen (Greaves et al., 2001). Außerdem ist ein genetischer Polymorphismus, der eine verminderte Expression von CX3CR1 bedingt, mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (McDermott et al., 2001; Moatti et al., 2001). Die Autoren schließen daraus auf eine Beteiligung des CX3CR1 in der Pathogenese der KHK. Unsere Ergebnisse belegen in der Gesamtkohorte allerdings keine Assoziation mit der KHK; vielmehr zeigt der Vergleich mit Probanden aus der I LIKE HOME Studie einen größeren relativen Anteil von CD14⁺CD16⁺ Monozyten in der gesunden Kontrollgruppe. Dies spräche eher gegen einen kausalen Effekt in der Atherogenese trotz der diskutierten potentiell proatherosklerotischen Wirkung von FKN / CX3CR1. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen von Rogacev (2008) und Ulrich et al (2008), die bei gesunden Probanden respektive bei nierentransplantierten Patienten einen Zusammenhang der Zellzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten und der IMT als Marker der subklinischen Atherosklerose fanden. Allerdings wurden hierbei die absoluten Zellzahlen berücksichtigt, während in der aktuellen Studie Unterschiede nur im relativen Anteil der CD14⁺CD16⁺ Monozyten an allen Monozyten auftraten. Dieses Phänomen kann zum Teil wie oben bereits geschildert durch die absolute Zunahme der Hauptpopulation erklärt werden

5.3 Monozyten und Adipositas

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit stellt die positive Korrelation zwischen einer steigenden Zahl zirkulierender CD14⁺CD16⁺ Monozyten und pathologischen Veränderungen von BMI und Bauchumfang dar. Nur die Anzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten korreliert darüber hinaus positiv mit einer Insulinresistenz, die über HOMA-Modelle (homeostasis model assessment) berechnet wurde. Unsere Ergebnisse weisen auf eine potentielle Verbindung zwischen erhöhten Zellzahlen proinflammatorischer Monozyten und der Insulinresistenz hin, welche ihrerseits aus dem proinflammatorischen Potential des Fettgewebes resultiert.

So konnte für das Fettgewebe von adipösen Patienten gezeigt werden, dass es prinzipiell mehr proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF- α , IL-6, TGF- β 1, CRP und MCP-1 produziert als das Fettgewebe normalgewichtiger Patienten (Shoelson et al., 2006). Die vermehrte Ausschüttung solcher Zytokine wird im Allgemeinen über eine Verstärkung

proinflammatorischer Signale erklärt, die von Adipozyten initiiert und von Makrophagen des Fettgewebes verstärkt werden (Shoelson et al., 2006). Diese Fettgewebsmakrophagen (ATM / adipose tissue macrophages) entwickeln sich aus Monozyten, die im peripheren Blutstrom am Endothel entlang “rollen”, an aktivierte Endothelzellen adhärieren und durch Extravasation in das Fettgewebe auswandern. Dort differenzieren sie zu Makrophagen, die unter bestimmten Vorraussetzungen bis zu 40% der Zellen eines Fettgewebsdepots ausmachen können (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003) und als eine Hauptquelle proinflammatorischer Zytokine angesehen werden (Neels / Olefsky, 2006).

Für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 wurde wiederum gezeigt, dass sie die Glukoseaufnahme von Adipozyten deutlich herabsetzen (Hotamisligil et al., 1993; Hotamisligil et al., 1995), unter anderem durch eine Verminderung der Expression von Insulinrezeptoren (Lumeng et al., 2006). ATM können somit durch TNF- α Produktion die Entwicklung einer Insulinresistenz erheblich fördern (Shoelson et al., 2006). Eine entscheidende Frage bleibt, aus welchen Vorläuferzellen sich diese ATM entwickeln.

Belge und Mitarbeiter konnten zudem für CD16⁺ Monozyten (als Summe aus CD14⁺⁺CD16⁺ und CD14⁺CD16⁺ Monozyten) eine dreifach erhöhte TNF- α Produktion im Vergleich zu den CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten nachweisen (Belge et al., 2002). Von uns wurde nun gezeigt, dass nur eine Untergruppe der Monozyten – CD14⁺CD16⁺ - sowohl mit Adipositas (Gewicht, BMI, Bauchumfang) und der Insulinresistenz (IRI_{HOMA} und ISI_{HOMA}) positiv korreliert sind.

Im Prinzip sind zwei mögliche Zusammenhänge zwischen Monozytenheterogenität, proinflammatorischen ATM und Adipositas denkbar: Entweder wandern innerhalb der Gesamtmonozyten bevorzugt die CD14⁺CD16⁺ Monozyten – etwa aufgrund ihrer distinkten Ausstattung mit Chemokinrezeptoren (z. B. CX3CR1) in entsprechende Fettgewebsdepots aus, um sich hier in proinflammatorische ATM zu entwickeln. Andererseits ist auch ein phänotypischer Switch innerhalb der Monozyten oder der Makrophagen durch die Vielzahl proinflammatorischer Signale des Fettgewebes denkbar. Demnach würden nicht spezifisch aus einer Monozytensubpopulation Zellen in das Fettgewebe rekrutiert, sondern prinzipiell Monozyten jeden Phänotyps. Erst innerhalb der Gewebe würde durch z.B. TNF- α ein phänotypischer Switch erfolgen.

Eine entscheidende Frage muss also noch gestellt werden: Ist die selektive Auswanderung proinflammatorischer Monozyten in das Fettgewebe dort für ein hohes Maß an Inflammation

verantwortlich, das sich in einer verstärkten Insulinresistenz adipöser Patienten äußert, oder sorgt vielmehr das Fettgewebe mit entsprechenden Zytokinen für einen phänotypischen Switch von Monozyten und Makrophagen und es lassen sich deswegen auch mehr dieser Monozyten im Blut nachweisen. Im Mausmodell wurde die Möglichkeit des phänotypischen Switch bei ATM bereits beschrieben (Lumeng et al., 2007). Einen weiteren Hinweis auf den relevanten Einfluss einer Adipositas auf die einzelnen Monozytenpopulationen gibt eine kleine Arbeit von Cottam und Mitarbeitern aus dem Jahr 2002. Bei 26 stark übergewichtigen Patienten ($\text{BMI} > 40 \text{ kg/m}^2$) wurde nicht nur ein stark erhöhter Anteil CD16^+ Monozyten (keine Differenzierung zwischen $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ und $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$) gegenüber Kontrollen (14,3 % vs 5,25 %) beobachtet, sondern auch nach chirurgischer Korrektur („gastric bypass surgery“) innerhalb eines Jahres wiederum eine deutliche Abnahme (von 14,3 % auf 8,8 %) des Anteils dieser Monozytensubpopulation (Cottam et al., 2002). Somit führt ein relevanter Gewichtsverlust adipöser Probanden nicht nur zu einer signifikanten Abnahme löslicher Zytokine wie CRP, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 oder Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 (Nicoletti et al., 2001; Heilbronn et al., 2001), sondern auch zu einer deutlichen Abnahme derjenigen Zellen, die in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine zu produzieren. In unserer Arbeit konnte nun ein weiterer Anhaltspunkt für die enge Verknüpfung zwischen einer Monozytensubpopulation und Parametern der Adipositas, sowie der Insulinresistenz dargelegt werden. Darüber hinaus konnte von uns im Unterschied zu der Arbeit von Cottam und Mitarbeitern innerhalb der heterogenen CD16^+ Monozyten, die $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Subpopulation als besonders mit Markern der Adipositas assoziiert dargestellt werden.

Weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe erbrachten Hinweise auf eine mögliche Verbindung zwischen der Adipositas und der Zunahme der $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Monozytenpopulationen. Das Adipozytokin Adiponectin (Dosis $1 \mu\text{g}$) war in in-vitro Untersuchungen in der Lage, den Anteil der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ und $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Monozyten maßgeblich zu reduzieren (von 4,2 % auf 0,4 % und 9,8 % auf 1,7 %; unveröffentlichte Daten). Der Serumspiegel von Adiponectin wiederum ist bei Patienten mit Adipositas deutlich reduziert und korreliert invers mit einer Insulinresistenz (Tilg / Moschen, 2006). Darüber hinaus induziert eine Gewichtsabnahme die Synthese von Adiponectin deutlich (Bruun et al., 2003). Diese Mechanismen erklären möglicherweise zum Teil die Ergebnisse unserer Studie, wonach durch Adipositas ein niedriger Adiponectinspiegel bedingt würde, der zu einer anteiligen Zunahme der $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ Monozyten führt. In zukünftigen

Untersuchungen sollte dementsprechend im Zusammenhang mit Monozytensubpopulationen auch der Serumspiegel von Adipozytokinen wie Adiponectin bestimmt werden, um den Einfluss dieses Zytokins auf die verschiedenen Monozytensubpopulationen zu quantifizieren.

5.4 Einschränkungen

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer Querschnittsanalyse der ersten 440 Probanden, die im Rahmen der prospektiven HOM sweet HOME Studie untersucht wurden. Somit können, wie in jeder epidemiologischen Querschnittsarbeit, zunächst nur Assoziationen zwischen verschiedenen Parametern aufgezeigt werden, aber keine Kausalitäten.

Das Einschlusskriterium einer Indikation zur Koronarangiographie bot auf der einen Seite die Möglichkeit, die KHK mit dem derzeitigen Goldstandard zu klassifizieren, andererseits wurde aufgrund dessen das zu untersuchende Patientenkollektiv stark selektiert. Daher divergieren Patienten mit KHK weniger von den untersuchten vermeintlichen Kontrollprobanden als in Studien, in denen die Kontrollpersonen aus der gesunden Allgemeinbevölkerung rekrutiert wurden. Außerdem wurde ein Teil der rekrutierten Patienten bereits zum wiederholten Male koronarangiographiert, so dass ein Einfluss vorangegangener Therapiekonzepte auf die Monozytensubpopulationen nicht ausgeschlossen werden kann.

Insbesondere der Einfluss einer medikamentösen Therapie mit Statinen, die bei 69,2 % der KHK-Patienten zum Untersuchungszeitpunkt bestand, kann nur schwer abgeschätzt werden. Eine signifikante Abnahme der Monozytenzahl innerhalb der Gesamt- oder Subpopulationen unter Statintherapie konnte in unserer Kohorte zwar nicht nachgewiesen werden, allerdings ist eine immunmodulatorische Komponente als sehr wahrscheinlich anzusehen (Shimada et al., 2006). Hervorzuheben ist die JUPITER-Studie, die Überlebensvorteile unter Rosuvastatintherapie bei Patienten mit erhöhtem CRP, aber normalen Cholesterinwerten einer verminderten Inflammation zuschreibt (Ridker et al., 2008).

Einen Effekt der Statinmedikation auf die Verteilung der Monozytensubpopulationen kann in unserer verhältnismäßig kleinen Kohorte naturgemäß so nicht gezeigt werden, weil verschiedene Statinpräparate in unterschiedlicher Dosierung bei unseren Patienten zur Anwendung kamen und eine Stratifikation nach Wirkstoffen und Dosierung wegen zu geringer Anzahl nicht sinnvoll erschien. Es wurde aber bereits der unterschiedliche Einfluss

einer Therapie mit Statinen auf die divergenten Monozytensubpopulationen berichtet. So resultierte aus einer Therapie mit Fluvastatin nach Randomisierung von 76 Patienten mit Koronarer Herzerkrankung und Hypercholesterinämie in eine Interventions- und eine Kontrollgruppe neben einer erwartungsgemäßen Senkung des LDL-Cholesterins und einer deutlichen Abnahme der $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten, auch eine Zunahme der $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozytensubpopulation (Rothe et al., 1996; Rothe et al., 1999). Allerdings wurden nur relative Zellzahlveränderungen berichtet, so dass nicht auszuschließen ist, dass die relative Zunahme der $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozytensubpopulation allein aus einer absoluten Verminderung der $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten resultiert. In einer anderen Arbeit bei einer hochselektierten Gruppe von herztransplantierten Patienten wurde zudem der unterschiedlich starke Einfluss verschiedener Statinpräparate auf die einzelnen Monozytensubpopulationen untersucht. Atorvastatin führte demnach zu einer stärkeren Abnahme der Zellzahlen der $CD14^{++}CD16^{-}$ Monozyten als Pravastatin, während Pravastatin zu einer deutlicheren Senkung der $CD14^{+}CD16^{+}$ Monozytenzahlen führte (Fildes et al., 2008). Insgesamt kann aber von einer Senkung der Monozytenzahl durch eine Statintherapie ausgegangen werden, so dass die dargestellten Assoziationen in der vorliegenden Arbeit eher als unter- denn als überschätzt angesehen werden sollten.

5.5 Schlussfolgerungen

5.5.1 Beantwortung der Hypothesen

- Hypothese 1: $CD16^{+}$ Monozyten sind in der nierengesunden Allgemeinbevölkerung mit dem Vorliegen der Koronaren Herzkrankheit assoziiert.

Die Hypothese muss verworfen werden, da in unserem Patientenkollektiv $CD16^{+}$ Monozyten nicht mit dem Vorliegen der Koronaren Herzkrankheit assoziiert sind.

- Hypothese 2: $CD16^{+}$ Monozyten sind in der nierengesunden Allgemeinbevölkerung Prädiktoren zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse.

Die Beantwortung dieser Hypothese erfolgt nach Abschluss der Nachbeobachtung unseres Studienkollektivs, welche nicht Inhalt der vorliegenden Dissertationsarbeit ist.

5.5.2 Ausblick

Die vorliegende Arbeit steht im Widerspruch zu einer früheren Arbeit, die eine Zunahme präsumtiv proinflammatorischer CD16⁺ Monozyten bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit postuliert. Diese Diskrepanz führen wir auf die Weiterentwicklung der verwendeten durchflusszytometrischen Messmethodik zurück. Allerdings stehen die Ergebnisse der longitudinalen Nachbeobachtung unserer Patienten zum jetzigen Zeitpunkt noch aus, so dass über Monozyten als Prognosemarker zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse bei nierengesunden Menschen noch keine Aussage gemacht werden kann. In jedem Falle weist die fehlende Assoziation zwischen Zellzahlen einzelner Monozytensubpopulationen und prävalenter Koronarer Herzkrankheit in unserem Patientenkollektiv darauf hin, dass Erkenntnisse, die bei chronisch nierenkranken Patienten über die Bedeutung der Monozytenheterogenität getroffen werden, nicht unkritisch auf nierengesunde Patienten übertragen werden dürfen.

Auf der anderen Seite belegen unsere Ergebnisse, dass zukünftige Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf die Bedeutung der Heterogenität der Monozyten in der Adipositas legen sollten. Weiterführende Untersuchungen sollten insbesondere den Einfluss verschiedener Adipozytokine wie Adiponectin, Leptin, Resistin und Visfatin auf die Monozytenfunktion untersuchen und in Betracht ziehen, dass durch Zytokine des Fettgewebes die Differenzierung der Monozyten beeinflusst wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Aiello RJ, Bourassa PAK, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM, 1999: Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1518-1525
2. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D, 2003: Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16⁺ Monocytes. *J. Exp. Med.* 197: 1701-1707
3. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock HWL, 2002: The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168: 3536-3542
4. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF, 1998: Decreased lesion formation in CCR2(-/-) mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394: 894-897
5. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B, 2003: Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: In vivo and in vitro investigations in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: 527-533
6. Charo IF, Taubman MB, 2004: Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circul. Res.* 95: 858-866
7. Cottam DR, Schaefer PA, Shafan GW, Velcu L, Angus LDG, 2002: Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes. Surg.* 12: 335-342
8. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM, 1990: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceed. Nat. Acad. Scienc. USA* 87: 5134-5138
9. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GDO, Pepys MB, Gudnason V, 2004: C-Reactive Protein and Other Circulating Markers of

- Inflammation in the Prediction of Coronary Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* 350: 1387-1397
10. Dawson, TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N, 1999: Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143: 205-211
11. Fildes JE, Shaw SM, Mitsidou A, Rogacev K, Leonard CT, Williams SG, Yonan N, 2008: HMG-CoA reductase inhibitors deplete circulating classical and non-classical monocytes following human heart transplantation. *Transpl. Immunol.* 19: 152-157
12. Glass CK, Witztum LW, 2001: Atherosclerosis – The Road Ahead. *Cell* 104: 503-516
13. González P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, Cubero GI, Cortina A, Coto E, 2001: Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes and Immunity* 2: 191-195
14. Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W, 2004: Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke* 35: 1147-1152
15. Greaves DR, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Ylä-Herttuala S, 2001: Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 923-929
16. Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rolling BJ, 1997: Transgenic Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) in Pancreatic Islets Produces Monocyte-Rich Insulitis Without Diabetes: Abrogation by a Second Transgene Expressing Systemic MCP-1. *J. Immunol.* 159: 401-408
17. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Sowers JR, 1999: Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation* 100: 1134-1146
18. Grundy SM, 2001: Approach to Lipoprotein Management in 2001 National Cholesterol Guidelines. *Am. J. Cardiol.* 90: 11-21

19. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ, 1998: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* 2: 275-281
20. Gurm HS, Bhatt DL, Lincoff AM, Tcheng JE, Kereiakes DJ, Kleiman NS, Jia G, Topol EJ, 2003: Impact of preprocedural white blood cell count on long term mortality after percutaneous coronary intervention: Insights from the EPIC, EPILOG, and EPISTENT trials. *Heart* 89: 1200-1204
21. Hansson GK, 2005: Mechanisms of disease: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352: 1685-1695+1626
22. Hansson GK, Libby P, 2006. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. *Nature Rev. Immunol.* 6: 508-519
23. Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM, 2001: Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 968-970
24. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Köhler H, Girndt M, 2008: CD14++CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Intern.* 73: 622-629
25. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, Renlund DG, Muhlestein JB, 2005: Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J. Am. Coll. Cardiol.* 45: 1638-1643
26. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM, 1993: Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91
27. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM, 1995: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95: 2409-2415
28. Hume DA, 2006: The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 49-53

29. Jonasson L, Holm J, Skalli O, 1986: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6: 131-138
30. Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, 1991: Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv. Experim. Med. Biol.* 305: 57-64
31. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR, 2007: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117: 175-184
32. Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW, 2004: Leukocyte count and coronary heart disease: Implications for risk assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44: 1945-1956
33. McDermott DH, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM, 2001: Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ. Res.* 89: 401-407
34. Moatti D, Faure S, Fumeron F, El Walid Amara M, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C, 2001: Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 97: 1925-1928
35. Neels JG, Olefsky JM, 2006: Inflamed fat: What starts the fire? *J. Clin. Invest.* 116: 33-35
36. Nicoletti G, Giugliano G, Pontillo A, Cioffi M, D'Andrea F, Giugliano D, Esposito K, 2003: Effect of a multidisciplinary program of weight reduction on endothelial functions in obese women. *J. Endocrinol. Invest.* 26: 5-8
37. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL, 1989: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534
38. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Thorgeirsson T, Pyörälä K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H: 1994: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344: 1383-1389

39. Phan A, Shufelt C, Merz CN, 2009: Persistent chest pain and no obstructive coronary artery disease. *JAMA* 301: 1468-74
40. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D, 1987: Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 2995-2998
41. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, 1990: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 254-257
42. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH, 1997: Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.* 336: 973-979
43. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ, 2008: Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* 359: 2195-2207
44. Rogacev K, 2008: Monozytenheterogenität und subklinische Atherosklerose. Dissertation, Universität des Saarlandes.
45. Ross R, 1999. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115-126
46. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stöhr J, Kindermann W, Schmitz G, 1996: Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 1437-1447
47. Rothe G, Herr AS, Stöhr J, Abletshauser C, Weidinger G., Schmitz G, 1999: A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 144: 251-261

48. Schechter AD, Berman AB, Yi L, Ma H, Daly CM, Soejima K, Rollins BJ, Charo IF, Taubman MB, 2004: MCP-1-dependent signalling in CCR2-/- aortic smooth muscle cells. *J. Leukoc. Biol.* 75: 1079-1085
49. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ, 2004: CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α levels. *Thromb. Haemost.* 92: 419-424
50. Shimada K, Park JK, Daida H, 2006: T helper 1/T helper 2 balance and HMG-CoA reductase inhibitors in acute coronary syndrome: Statins as immunomodulatory agents? *Eur. Heart. J.* 27: 2916–2918
51. Skalén K, Gustafsson M, Knutsen Rydberg E, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J, 2002: Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417: 750-754.
52. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB, 2006: Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116: 1793-1801
53. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Järvinen H, Van Haeften T, Renn W, Gerich J, 2000: Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diab. Care* 23: 295-301
54. Szalai C, Duba J, Prohászka Z, Kalina A, Szabó T, Nagy B, Horváth L, Császár A, 2001: Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 158: 233-239
55. Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N, 1995: CD14^{low}CD16^{high}: A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol.* 25: 3418-3424
56. Tilg H, Moschen AR, 2006: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Rev. Immunol.* 6: 772-782
57. Ulrich C, Heine GH, Gerhart MK, Köhler H, Girndt M, 2008: Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. *Am. J. Transplant.* 8: 103-110

58. Umehara H, Goda S, Imai T, Nagano Y, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Bloom ET, Domae N, 2001: Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1. *Immunol. Cell Biol.* 79: 298-302
59. Urra X, Villamor N, Amaro S, Gómez-Choco M, Obach V, Oleaga L, Planas AM, Chamorro A, 2009: Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J. cerebral blood flow and metabolism* 29: 994-1002
60. Van der Wal AC, Das PK, Bentz D, Van de Berg DB, Van der Loos CM, Becker AE, 1989: Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Labor. Invest.* 61: 166-170
61. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AEI, Mach F, 2004: Antagonism of RANTES Receptors Reduces Atherosclerotic Plaque Formation in Mice. *Circ. Res.* 94: 253-261
62. Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, Shen W, Orth SR, Kuebler W, Kreuzer J, 2002: Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- κ B and activator protein-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 914-920
63. Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS, 2006a: Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N. Engl. J. Med.* 355: 2631-2639
64. Wang Q, Hunt SC, Xu Q, Chen YE, Province MA, Eckfeldt JH, Pankow JS, Song Q, 2006b: Association study of CRP gene polymorphisms with serum CRP level and cardiovascular risk in the NHLBI Family Heart Study. *Am. J. Physiol. - Heart Circul. Physiol.* 291: 2752-2757
65. Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR, 2001: Monocyte chemotactic protein 1 amplifies serotonin-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Vasc. Res.* 38: 341-349
66. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr. AW, 2003: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796-1808

67. Wheeler JG, Mussolino ME, Gillum RF, Danesh J, 2004: Associations between differential leucocyte count and incident coronary heart disease: 1764 incident cases from seven prospective studies of 30,374 individuals. *Eur. Heart J.* 25: 1287-1292.
68. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H, 2001: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112: 1821-1830
69. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Grande P, Silleesen H, Nordestgaard BG, 2008: Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 359: 1897-1908
70. Ziegler-Heitbrock HWL, 1996: Heterogeneity of human blood monocytes: The CD14+CD16+ subpopulation. *Immunol. Today* 17: 424-428
71. Ziegler-Heitbrock HWL, 2007: The CD14+ CD16+ blood monocytes: Their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81: 584-592

7 Danksagung

Den folgenden Personen möchte ich für ihre Unterstützung bei meiner Promotionsarbeit danken:

Meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Gunnar Heine möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Er hat mir ein interessantes Thema zur Verfügung gestellt, sich in sehr hohem Maße für diese Arbeit engagiert und meine Arbeit jederzeit mit konstruktiven Anregungen begleitet. Das persönliche Verhältnis habe ich als sehr angenehm empfunden. Vielen Dank!

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem sehr engagierten Betreuer Dr. rer. nat. Christof Ulrich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor, seine vielen konstruktiven Vorschläge und Anregungen sowie das kritische Gegenlesen meiner Dissertation.

Ich danke Prof. Dr. Hans Köhler und Prof. Dr. Danilo Fliser, Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten und Prof. Dr. Michael Böhm, Klinik für Innere Medizin III - Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin, dass sie mir die Promotionsarbeit in ihren Kliniken ermöglicht haben.

Ich bedanke mich bei Frau Martina Wagner für die hervorragende Unterstützung meiner Arbeit im Labor und danke dem gesamten Team des Nephrologischen Labors unter Leitung von Frau Prof. Dr. Martina Sester für die angenehme Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gebührt dem gesamten Team der Kardiologischen Ambulanz. Stellvertretend bedanke ich mich bei Schwester Dorothea Wagner für das hohe, nicht selbstverständliche, Engagement ihres gesamten Teams. Ihre Unterstützung trägt weiterhin maßgeblich zum Gelingen der HOM sweet HOME –Studie bei.

Prof. Dr. Bruno Scheller, Leiter der Abteilung für Klinische und Experimentelle Interventionelle Kardiologie und Herrn Dr. Bodo Cremers danke ich, dass sie jederzeit einen reibungslosen Ablauf dieser Studie ermöglicht haben.

Ein großer Dank gebührt alten und neuen Freunden, die meinen Weg bis zum Studium unterstützt haben und während des Studiums für einiges an willkommener Abwechslung gesorgt haben.

Ich möchte mich abschließend bei meiner Familie für die große Unterstützung während des Studiums und auch während der Wartezeit bedanken.

Danke, dass ihr mir dieses Studium ermöglicht habt!

8 Publikation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden zur Publikation im European Heart Journal akzeptiert:

Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin Z, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Köhler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH, 2009: Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur. Heart J.* (in press)

9 Anhang

9.1 Material

9.1.1 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg, D
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, D
15 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
50 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Einmalplastikpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Cornig Costar, Wiesbaden
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Filterpipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Greiner, Frickenhausen, D
4,7 ml Lithium-Heparin Gel-, 4,7 ml Serum-Gel-, 5 ml Citrat-, 2,7 ml Kalium-EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sheath Fluid	Dako, Cytomation, Hamburg, D
Parafilm ``M``	Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen, D

Tabelle11: Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen der Studien zum Einsatz kamen.

9.1.2 Geräte

Autoklav Systec 2540 EL	Systec GmbH, Wettenberg, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, D
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Eppendorfszentrifuge Minifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Feinwaage Ohaus	Ohaus Corporation, Florham Park, USA
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Homburg, D
Gilson Kolbenhubpipetten	Abimed, Langenfeld, D
Kühlschrank +4°C°	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Laborwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen, D
pH –Meter CG 825	Schott, Mainz, D
Pipetboy plus	Integra Biosciences, Fernwald, D
Minishaker IKA	IKA-Works, Wilmington, USA
Spannungsquelle Consort E425	UniEquip, Martinsried, D
Sterile Werkbank Laminair HB2472	Heraeus Instruments, Hanau, D
Vortex Mixer K	NeoLab, Heidelberg, D
Wasseraufbereiter MilliQ UF plus	Millipore, Eschborn, D
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 12: Geräte, die im Rahmen der Studien zum Einsatz kamen.

9.1.3 Monoklonale Antikörper

<u>Monoklonale Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Anregungs- wellenlänge (nm)</u>	<u>Emissions- wellenlänge (nm)</u>
Anti-CD14 PerCP	M-Phi-P9	Becton Dickinson, Heidelberg, D	490	675
Anti-CD16 APC	3G8	Invitrogen , Karlsruhe, D	650	660
Anti-CD86 PE	HA5.2B7	Beckman Coulter, Krefeld, D	480	578
Anti-CD143 FITC	9B9	Biozol, Krefeld oder Serotec, Düsseldorf, D	495	520

Tabelle 13: Monoklonale Antikörper zur Charakterisierung der Monozytenheterogenität.

Es handelt sich um murine anti-humane Antikörper.

9.1.4 Substanzen

Aqua injectabile	Braun, Melsungen, D
BD FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BSA	Serva Heidelberg, D
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FCS	Seromed, Berlin, D
NaN ₃	Serva, Heidelberg
PBS	Biochrom, Berlin, D
PFA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

Tabelle 14: Substanzen, die im Rahmen der Studien verwendet wurden.

BSA = Albumin Bovine Fraction IV; FCS = Fötales Kälberserum; PBS = Phosphate Buffered Saline; PFA = Paraformaldehyd

9.1.5 Puffer und Medien

<u>Name</u>	<u>Ingredienz</u>	<u>Menge</u>
FACS-Puffer (filtriert)	BSA	2,5 mg
	NaN ₃ 10%	3,5 ml
	PBS	500 ml
	FCS	25 ml
Lysing Solution	BD-Lysing Solution 10-fach	50 ml
	Aqua dest.	450 ml
NaN₃ 10%	NaN ₃	10 g
	PBS	100 ml
PFA 1%	PFA 4%	25 ml
	PBS	75 ml

Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien.

BSA = Albumin Bovine Fraction IV; FCS = Fötales Kälberserum; PBS = Phosphate Buffered Saline; PFA = Paraformaldehyd

9.2 Fragebogen zur Erhebung pectanginöser Beschwerden und pAVK

Proband _____ Geburtsdatum _____ Geschlecht _____
Untersuchungsdatum __.__.200__

Ethnizität O Kaukasier O Asiat
 O Afroamerikaner O _____

Körpergröße ohne Schuhe _____

Körpergewicht leicht bekleidet _____ O gemessen O gefragt

1. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?

O Ja

O Nein (*falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit 10*)

2. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls Nein, weiter mit Frage 9*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

3. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

4. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

O Ich halte an oder laufe langsamer

O Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 9*)

Bei Benutzung von Nitrospray: „Ich halte an oder laufe langsamer“ ankreuzen.

5. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

☐ Es kommt zu einer Erleichterung

☐ Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 9*)

6. Wie rasch?

☐ Innerhalb von 10 Minuten.

☐ Nicht innerhalb von 10 Minuten (*weiter mit Frage 9*).

7. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.

☐ Sternum (oberes oder mittleres Drittel)

☐ Sternum (unteres Drittel)

☐ Linksseitige vordere Brustwand

☐ Linker Arm

(alle Angaben notieren)

8. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonst wo?

☐ Ja (Notieren wo _____)

☐ Nein

9. Hatten Sie jemals einen schweren Schmerz über die Vorderseite Ihres Brustkorbes, der über dreißig Minuten oder länger anhielt?

☐ Ja

☐ Nein

10. Bekommen Sie Schmerzen beim Gehen in einem oder beiden Bein?

☐ Ja

☐ Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

11. Begann dieser Schmerz jemals beim Stehen in Ruhe oder beim Sitzen?

☐ Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel nicht ein (*weiter Frage 19*)

13. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

14. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

16. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

O Ich halte an oder laufe langsamer

O Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 19*)

17. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

O Es kommt zu einer Erleichterung

O Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 19*)

18. Wie rasch?

O Innerhalb von 10 Minuten.

O Nicht innerhalb von 10 Minuten

19. Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

O Ja (Details notieren)

O Nein

20. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

O Ja (Details notieren)

O Nein

21. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?

O Ja (Details notieren)

O Nein

22. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

O Ja (Details notieren)

O Nein

23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt?

O Ja (Details notieren)

O Nein

24. Ist bei Ihnen eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung bekannt?

O Ja (Details notieren)

O Nein

25. a Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?

O Ja (Details notieren)

O Nein

b Hatten Sie in diesem Rahmen Fieber $>38,0^{\circ}\text{C}$?

O Ja

O Nein

26. Haben Sie jemals geraucht?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 31*)

27. Rauchen Sie aktuell?

O Ja (*weiter mit Frage 29*)

O Nein

28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

29. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht?

30. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich in diesen Jahren am Tag geraucht?

31. Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

32. Hat eines oder mehrere Ihrer Geschwister einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

33. Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 35*)

34. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

O Insulin

O blutzuckersenkende Tabletten

O Diät

35. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mind. 30 min sportlich in einer Intensität, die Sie zum Schwitzen bringt?

(falls „0“, weiter Frage 37)

36. Welche Sportarten betrieben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

37. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern?

O Ja

O Nein

38. Ist bei Ihnen eine Nierenerkrankung bekannt?

O Ja

O Nein (Weiter mit Frage 40).

39. Welche Nierenerkrankung ist bei Ihnen bekannt?

40. Wie viele Gläser Alkohol trinken Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag?

davon _____ Gläser Bier (350 ml)

_____ Gläser Weißwein (150 ml)

_____ Gläser Rotwein (150 ml)

_____ Gläser Spirituosen (40 ml)

41. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente oder Hormonpräparate wie die Pille ein?
- ☐ Ja
- ☐ Nein
42. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?
43. Ist bei Ihnen ein Bluthochdruck, also ein Blutdruck von mehr als 140 mmHg systolisch oder 90 mmHg diastolisch, wenn keine blutdrucksenkenden Medikamente eingenommen werden, bekannt?
- ☐ Ja
- ☐ Nein (weiter mit Frage 45)
44. Seit wann ist dieser Bluthochdruck bekannt?
- ☐ Länger als ein Jahr
- ☐ Kürzer als ein Jahr
45. Leiden Sie unter Luftnot bei körperlicher Anstrengung?
- ☐ Ja (weiter mit Frage 47)
- ☐ Nein (weiter mit Frage 49)
46. Tritt diese Luftnot bei durchschnittlichem Gehtempo auf?
- ☐ Ja, innerhalb der ersten 200 m
- ☐ Ja, aber erst nach den ersten 200m
- ☐ Nein, nicht bei durchschnittlichem Gehtempo
47. Tritt diese Luftnot bereits in Ruhe auf?
- ☐ Ja
- ☐ Nein

48. Dürfen wir in einem, drei und fünf Jahren mit Ihnen, Ihren Angehörigen und / oder Ihrem Hausarzt telefonisch Kontakt aufnehmen, um uns nach Ihrem Gesundheitszustand zu erkundigen?

Mit Patient O Ja Telefonnummer _____

O Nein

Mit Angehörigen O Ja Name _____

O Nein Telefonnummer _____

Mit Hausarzt O Ja Name _____

O Nein Telefonnummer _____

Nach 5 Minuten Ruhe

RR ____ / ____ re ____ / ____ li

HF ____

Hüftumfang (im Stehen, Höhe Trochanter major) _____ cm

Bauchumfang (im Stehen, Inspiration; Mitte zwischen unterster Rippe und Crista iliaca) _____ cm

Bauchumfang (im Stehen, Expiration; Mitte zwischen unterster Rippe und Crista iliaca) _____ cm

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hornof
Vorname	Florian
Geburtsdatum, -ort	08.02.1981 in Hildesheim
Eltern	Maria Hornof, Krankenschwester Dr. med. Jürgen Hornof, Arzt

Schulbildung

August 1987 – Juni 1991	Grundschule Greifswalderstraße, Hildesheim
August 1991 – Juni 2000	Gymnasium Andreanum, Hildesheim
30.06.2000	Abitur

Berufliche Tätigkeiten

30.09.2000 – 31.07.2001	Zivildienst DRK-Blutspendedienst NSTOB in Springe
01.08.2001 – 30.09.2001	Krankenpflegepraktikum Städtisches Krankenhaus, Hildesheim
01.10.2001 – 31.12.2001	Montagehelfer WABCO Fahrzeugtechnik, Gronau
01.01.2002 – 30.06.2003	Krankenpflegehelfer St. Bernward Krankenhaus, Hildesheim

01.11.2003 – 31.08.2004	Barkeeper DAX Bierbörse Betriebsgesellschaft mbH, Hildesheim
Juli 2007 – Juni 2009	Dozent für Anatomie Nanz Medico Akademie am St. Johannis Krankenhaus in Landstuhl, Staatlich anerkannte Schule für Physiotherapie und Massage

Universitäre Ausbildung

Oktober 2004	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin Universität des Saarlandes, Homburg
September 2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ab August 2009	Praktisches Jahr, Klinikum Merzig